

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

Mémoire présenté en vue de l'obtention
de la MAITRISE ES SCIENCES (Energie)

par

GENEVIEVE GALINIER

IMPORTANCE DU TRANSFERT D'ÉNERGIE DANS LE SYSTÈME CHLOROPHYLLE/
 β -CAROTENE A L'AIDE D'UN SPECTROFLUORIMETRE LASER.

Université du Québec à

TROIS-RIVIERES

MARS 1974

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Les membranes biologiques, animales comme végétales, sont toutes constituées selon le même modèle. Néanmoins les secondes ont l'extraordinaire pouvoir de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique grâce à divers pigments tels que chlorophylles et caroténoïdes, assurant ainsi la Photosynthèse.

Les étapes de cette transformation sont encore bien obscures et le présent travail a pour but d'apporter quelques éclaircissements sur les transferts d'énergie entre le β-carotène et la chlorophylle a. À cette fin les propriétés spectroscopiques (absorption, fluorescence, dépolarisation de la fluorescence, ...) serviront de moyens d'évaluation.

Pour simuler la structure lamellaire des membranes photosynthétiques les pigments sont étudiés à l'état de monocouches. Dans de telles conditions, la chlorophylle n'est que faiblement fluorescente, et notre équipe de laboratoire a dû réaliser un spectrofluorimètre très sensible utilisant comme source de lumière excitatrice un laser. Dès à présent des conclusions encourageantes sont mises en évidence:

- Le transfert d'énergie non radiatif, par résonance induite, de la chlorophylle a vers le β-carotène, est possible.

Dans les conditions: λ excitation: 632.8 nm

$$[\text{chlorophylle } \underline{a}] < 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$1.0 \times 10^{-6} \text{ M} < [\beta\text{-carotène}] < 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$$

la constante de quenching de la chlorophylle a par le β-carotène = $6.6 \times 10^8 \text{ mole}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$.

Lorsque la concentration du β -carotène est supérieure à $5.0 \times 10^{-4} M$, un mécanisme différent de celui-ci a lieu.

- Dans le thylakoïde, il semble très probable que les molécules de chlorophylle a soient orientées préférentiellement comme le montre le comportement de ce pigment en monocouche.

D'autre part:

- la zone de "self-quenching" de la chlorophylle a s'étend dans des domaines où sa concentration est supérieure à $8.0 \times 10^{-6} M$.
- A partir du mélange "1 β -carotène: 4 Acide Arachidique", établi comme étant idéal, la courbe de pression de surface du β -carotène s'avère identique à celle obtenue par Leblanc, R.M., Orger, B.H..

Nous avons également confirmé que:

- Le β -carotène n'est pas un pigment fluorescent à la température de la pièce et nous mettons en évidence qu'
- il fait partie du système "trappe" du thylakoïde où est retenu l'énergie nécessaire au déclenchement de la Photosynthèse.

Nous avons vu que le β -carotène joue le rôle d'un accepteur dans la chaîne de transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques, or son spectre d'absorption montre qu'il n'absorbe pas dans le rouge la lumière pouvant être émise par la chlorophylle.

Faut-il supposer qu'après excitation par de la lumière à 633 nm, un certain pourcentage de chlorophylle a, amené dans un état triplet, transfère une partie de l'énergie acquise au β -carotène, lui-même dans un état métastable? Le diagramme de Jablonski établi pour cette paire de molécules, montre qu'une telle transition $\pi^* - \pi^*$ est vraisemblable.

Une autre hypothèse peut être envisagée :

La chlorophylle a, à l'état de monomère, initialement "isolée" dans le thylakoïde, aurait tendance à se réorienter de manière à assurer une forme de couplage avec le β -carotène, forme sous laquelle le caroténoïde joue le rôle d'accepteur.

Dans des études ultérieures, qui feront l'objet d'une recherche pour l'obtention du diplôme de Doctorat, nous essayerons de prouver qu'

- un transfert d'énergie β -carotène \rightarrow chlorophylle a existe également.
- Il est prépondérant comparé à celui chlorophylle a \rightarrow β -carotène.
- En captant l'énergie lumineuse, dans la région "Bleu" du spectre, le caroténoïde prévient la photooxydation de la chlorophylle a.

Nous préciserons:

- La vitesse de transfert d'énergie entre le β -carotène et la chlorophylle a.
- La propriété éventuelle qu'à le β -carotène de "quencher" l'état singulet de la chlorophylle a.
- L'orientation de la chlorophylle a en monocouches mixte (chlorophylle a / β -carotène) après absorption de l'énergie lumineuse émise par le spectrofluorimètre He/Cd (λ excitation: 441.6 nm).

REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu, à exprimer ma plus profonde reconnaissance au Docteur Roger M. LEBLANC qui a dirigé d'une manière particulièrement vigilante et compréhensive mon travail de recherche.

Mes remerciements les plus sincères et respectueux vont aux personnes qui m'ont permis de poursuivre dans cette orientation: équipe de laboratoire, groupe de recherche, techniciens des ateliers de mécanique et d'électronique. Je leur sais gré de leurs encouragements et de leur collaboration.

Je voudrais également témoigner un peu de ma vive sympathie à l'égard des secrétaires qui ont contribué à la rédaction de ce mémoire.

Enfin, à toutes les personnes, qui de près ou de loin ont permis d'établir ce climat de confiance dans lequel j'ai pu travailler, j'adresse un très grand merci.

A Yves,

TABLE DES MATIERES

• INTRODUCTION	
Importance de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique dans la photosynthèse	1
• CHAPITRE I: LES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES CAROTENOÏDES ET CHLOROPHYLLIENS	2
I.1 Historique	3
I.2 Constitution chimique.	8
1. Chlorophylle <u>a</u>	8
2. Chlorophylle <u>b</u>	10
3. Caroténoïdes	11
4. Phycobilines	12
I.3 Leur rôle dans la cellule végétale	12
1. Généralités.	12
2. Les chlorophylles.	14
3. Les caroténoïdes	15
4. Les phycobilines	17
I.4 Propriétés photophysiques connues.	19
1. Absorption et fluorescence de la chlorophylle <u>a</u>	19
2. Processus photochimiques applicables à la chlorophylle <u>a</u>	23
3. Observations directes des réactions primaires impliquant la chlorophylle <u>a</u>	25
4. Propriétés photophysiques du β -carotène. Observations directes.	28
• CHAPITRE II: MECANISME DE TRANSFERT D'ENERGIE D'EXCITATION INTERMOLECULAIRE.	31
II.1 Théorie de Förster. Considérations générales.	32
II.2 Principes généraux de transfert d'énergie par résonance.	36
1. Transfert d'énergie électronique	37
- radiatif	38
- non radiatif	40

2.	Considérations générales sur le transfert d'énergie par résonance	40
II.3	Trois types d'interaction moléculaire: couplages fort, moyen, faible	45
1.	Transfert via l'interaction moléculaire dipôle-dipôle	45
2.	Couplage fort	50
3.	Couplage moyen.	50
4.	Couplage faible	51
II.4	Type d'interaction applicable aux pigments photosynthétiques	54
CHAPITRE III:	MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES	60
III.1	Pureté des produits et des solvants	61
III.2	Techniques des monocouches.	62
1.	Bain de Langmuir: Description de l'appareil	62
2.	Principe de la technique des monocouches.	67
3.	Critères de pureté de l'eau	75
4.	Calibration du bain. Courbes de pression de surface.	79
III.3	Spectrophotométrie d'absorption (Unicam SP 1800).	89
1.	Description	89
2.	Utilisation	91
III.4	Spectrofluorimétrie	91
1.	Spectrofluorimètre "Perkin-Elmer MPF-2A".	94
2.	Spectrofluorimétrie laser	94
-	Généralités	94
-	Description du système.	97
CHAPITRE IV:	PROCESSUS PHOTOPHYSIQUES	108
IV.1	Spectroscopie U.V.-Visible de la chlorophylle <u>a</u> , du β -carotène, et du mélange chlorophylle <u>a</u> / β -carotène.	109
1.	En solution	109
2.	A l'état solide	112
3.	En monocouche	112

IV.2	Luminescence à l'aide des spectrofluorimètres	
	Laser et Perkin-Elmer	133
1.	Détermination et comparaison de la sensibilité des deux systèmes	133
2.	Détermination de la zone de "self-quenching" de la chlorophylle <u>a</u>	133
3.	Comparaison des spectres de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> pure et des mélanges chlorophylle <u>a</u> / β -carotène	143
IV.3	Cinétique Stern-Volmer appliquée au mélange: chlorophylle <u>a</u> / β -carotène	150
1.	Rappel de la théorie	150
2.	Résultats expérimentaux	153
. CHAPITRE V:	DEPOLARISATION DE LA FLUORESCENCE	156
V.1	Hypothèses actuelles sur l'orientation de la chlorophylle.	157
1.	"In vivo"	157
2.	"In vitro".	157
V.2	Résultats expérimentaux	158
. CHAPITRE VI:	CONCLUSION.	166
. APPENDICES:	VII
	Appendice A: Schémas	VIII
	Appendice B: Tableaux.	IX
	Appendice C: Figures	XI
	Appendice D: Abréviations.	XIV
. BIBLIOGRAPHIE:	170

APPENDICES

SCHEMAS

. Appendice A: Schémas

Schéma 1	: Schéma d'un chloroplaste	4
Schéma 2	: Ultrastructure d'un chloroplaste (d'après Mühlethaler).	5
Schéma 3	: Ultrastructure d'un chloroplaste (d'après Calvin)	6
Schéma 4	: Molécule de chlorophylle <u>a</u>	7
Schéma 5	: Molécule de β -carotène	13
Schéma 6	: Bain de Langmuir	63
Schéma 7	: Bain de Langmuir	64
Schéma 8	: Technique des monocouches: Déposition d'un lipide	73
Schéma 9	: Spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF-2A (montage)	92
Schéma 10	: Spectrofluorimètre laser (montage)	99
Schéma 11	: Spectrofluorimètre laser. Détail du support rotatif des lamelles	98
Mécanisme de transfert d'énergie:		
Schéma (1)	: Transitions couplées	42
Schéma (2)	: Transitions couplées: courbes respectives d'absorption et de fluorescence.	42
Schéma (3)	: Représentation des ordres de grandeur de $ U $, $\Delta\epsilon$, $\Delta\epsilon'$	49
Schéma (4)	: Mécanismes possibles de "dégradation" de l'énergie et de transfert entre chl. <u>a</u> \rightleftharpoons β -carotène.	56

TABLEAUX

Appendice B: Tableaux

Tableau 1	: Absorption et fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> sous différentes formes.	19
Tableau 2	: Caractéristique des trois types de couplage dans la théorie de Th. Förster . . .	47
Tableau 3	: Evaluation des critères de pureté de l'eau disponible	77
Tableau 4	: Calibrage du Bain de Langmuir	80
Tableau 5	: Localisation du collapse pour différentes substances.	86
Tableau 6	: Absorption de monocouches de chlorophylle <u>a</u>	88
Tableau 7	: Vérification de la longueur d'onde du monochromateur du spectrofluorimètre laser	107
Tableau 8	: Comparaison des courbes de pression de surface pour différents mélanges β -carotène / acide arachidique.	125
Tableau 9	: Courbe de pression de surface du mélange 1 β -carotène: 4 acide arachidique .	122
Tableau 10	: Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration (spectrofluorimètre laser He/Ne) . .	134
Tableau 11	: Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF-2A.	135
Tableau 12	: Détermination de la zone de "self-quenching" de la chlorophylle <u>a</u>	141
Tableau 13	: Variation de l'intensité de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en présence de β -carotène (Spectrofluorimètre laser He/Ne).	144-145

Tableau 14 : Variation de l'intensité de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en présence de β -carotène (Spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF-2A)	146-147
Tableau 15 : Cinétique Stern-Volmer appliquée au mélange chlorophylle <u>a</u> / β -carotène	154
Tableau 16 : Dépolarisation de la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en monocouche.	163

FIGURES

• Appendice C: Figures

Figure 1	: Spectre d'absorption de divers pigments . .	20
Figure 2	: Distribution de l'absorption parmi les pigments	21
Figure 3	: Spectre d'absorption relative de différents pigments.	22
Figure 4	: Spectre d'absorption de trois types d'organismes photosynthétiques.	21
Figure 5	: Critère de pureté de l'eau.	78
Figure 6	: Calibrage de la balance de Langmuir . . .	81
Figure 7	: Courbe de pression de surface de l'acide arachidique	84
Figure 8	: Courbe de pression de surface de la chlorophylle <u>a</u>	85
Figure 9	: Spectre d'absorption de la chlorophylle <u>a</u> /diéthyléther.113
Figure 10	: Spectre d'absorption du β -carotène/diéthyléther.114
Figure 11	: Spectre d'absorption de la chlorophylle <u>a</u> /benzène115
Figure 12	: Spectre d'absorption du β -carotène/benzène116
Figure 13	: Spectre d'absorption du mélange chlorophylle <u>a</u> / β -carotène en solution117
Figure 14	: Spectre d'absorption d'un film de chlorophylle <u>a</u> (sur lamelle de quartz).118
Figure 15	: Courbe de pression de surface du β -carotène.120
Figure 16	: Spectre d'absorption de la chlorophylle <u>a</u> en monocouche123

Figure 17 : Courbes de pression de surface de mélanges β -carotène: acide arachidique.	127
Figure 18 : Courbe de pression de surface du mélange 1 β -carotène: 4 acide arachidique	128
Figure 19 : Spectre d'absorption du β -carotène en solution et en monocouche.	130
Figure 20 : Spectre d'absorption du mélange acide arachidique/ β -carotène/ chlorophylle <u>a</u> en monocouche.	132
Figure 21 : Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration (spectrofluorimètre MPF-2A et laser He/Cd)	136
Figure 22 : Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration. Spectrofluorimètres MPF-2A et laser He/Ne.	137
Figure 23 : Fluorescence d'une monocouche de chlorophylle <u>a</u> aux spectrofluorimètres MPF-2A et laser He/Cd	138
Figure 24 : Fluorescence d'une monocouche de chlorophylle <u>a</u> + phytol	140
Figure 25 : Détermination de la zone de "self quenching" de la chlorophylle <u>a</u>	142
Figure 26 : Variation de l'intensité de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction de la concentration de β -carotène.	148
Figure 27 : Cinétique Stern-Volmer appliquée aux mélanges chlorophylle <u>a</u> / β -carotène	155
Figure 28 : Décroissance de la fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en fonction du temps.	160
Figure 29 : Spectre de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en monocouche. Angle de polarisation de la lumière 0°	161
Figure 30 : Variation de l'intensité de fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> en monocouche en fonction de l'angle de polarisation de la lumière	164

Figure 31 : Fluorescence de la chlorophylle <u>a</u> à l'état solide (film)	165
--	-----

• Appendice D: Abréviations

chl <u>a</u>	: chlorophylle <u>a</u>
chl <u>b</u>	: chlorophylle <u>b</u>
β -carot.	: β -carotène
λ exc.	: longueur d'onde d'excitation
"I.S.C."	: combinaison inter-système
"C.I."	: conversion interne
sens.	: sensibilité
NanoA	: nanoampère
μ A	: microampère
"B.L.M."	: Bilayer (ou "Black") Lipid membrane
	: membrane lipidique à deux feuillets
[X] ou	
conc. de X	: concentration de la substance X

INTRODUCTION

De tous les organismes vivants, végétaux comme animaux, seules les plantes photosynthétiques peuvent s'autosuffire en utilisant comme source d'énergie le soleil.

La photosynthèse est ce mécanisme par lequel, sous l'action de la lumière, les plantes vertes élaborent leurs constituants organiques (à partir des seuls éléments gaz carbonique et eau) tout en libérant cet oxygène qui nous est vital. En effet grâce à des pigments variés contenus dans leurs tissus chlorophylliens, elles sont douées de l'extraordinaire pouvoir de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique directement utilisée pour assurer leur survie.

Les étapes de cette transformation demeurent encore bien obscures sur certains points, et s'il est bien connu, depuis longtemps déjà que des pigments appelés: chlorophylles, caroténoïdes, xanthophylles, phycobilines ont la propriété d'absorber des quanta de lumière, pour ensuite délivrer cette énergie à des molécules (ou groupes de molécules) chargées de réactions chimiques,

* Comment cette énergie est absorbée et,

* De quelle manière elle se propage jusqu'aux centres réactifs où a lieu la photosynthèse,

c'est ce que nous essayerons de mettre en évidence par la présente étude, en examinant plus spécifiquement l'interaction chlorophylle - caroténoïde.

CHAPITRE I

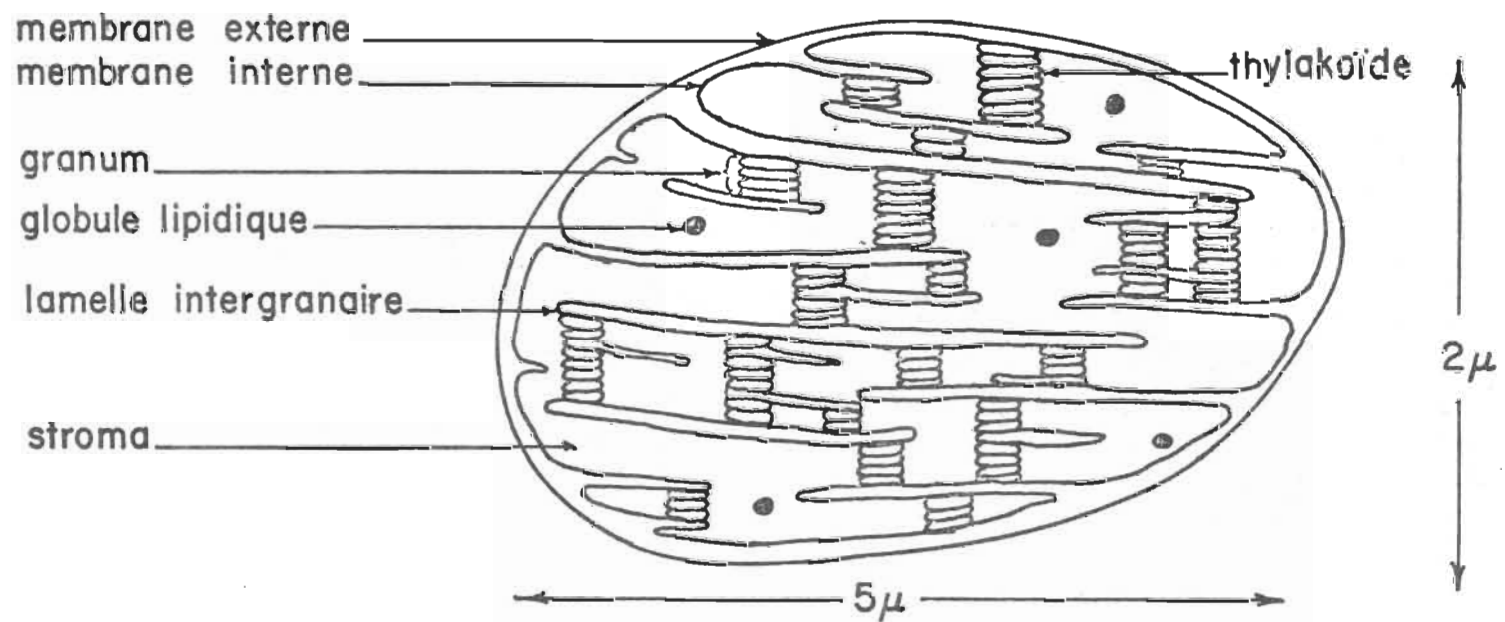
LES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES CAROTENOIDES ET CHLOROPHYLLIENS

I - LES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES CAROTENOIDES ET CHLOROPHYLLIENS

I.1 Historique

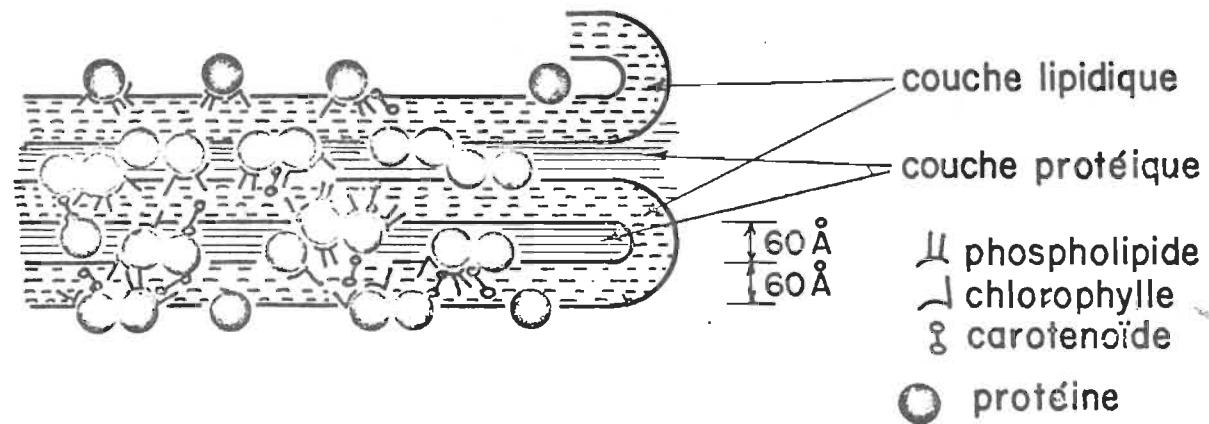
C'est vers 1930 que Heitz (1) puis Strugger (2), grâce à la microscopie optique, précisent la morphologie des plastides, organites cellulaires renfermant les pigments photosynthétiques. Avec l'avènement du microscope électronique, des progrès énormes se font jour quant à la structure des constituants du chloroplaste et des thylakoïdes (schéma 1). Par la suite, Frey-Wissling et Steinmann, en 1953, (3,4) ont poussé leurs recherches jusqu'à proposer la nature et la composition chimique d'un disque interplastidial. Actuellement, il semble que le modèle de Calvin (1954), plus que celui de Mllhlethaler (5), tout en demeurant insuffisant, reste celui de référence que l'on complète, ou à partir duquel on élabore des hypothèses (6) (schémas 2 et 3). Ainsi, pour appuyer, sinon confirmer l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle serait disposée entre 2 couches lipoprotéiques, au niveau d'une interface, phase hydrophile/phase hydrophobe, trois approches différentes peuvent être prises. Parmi les modèles des B.L.M. ("Bilipid Layer Membranes") (7,8), des micelles (9) et des monocouches (10) nous avons choisi d'utiliser ce dernier, car il facilite l'étude des transferts d'énergie entre molécules identiques ou non. La technique consiste à déposer un nombre connu de monocouches ou de "complexes" chlorophylliens sur une lamelle de quartz et à étudier leur

schéma.1



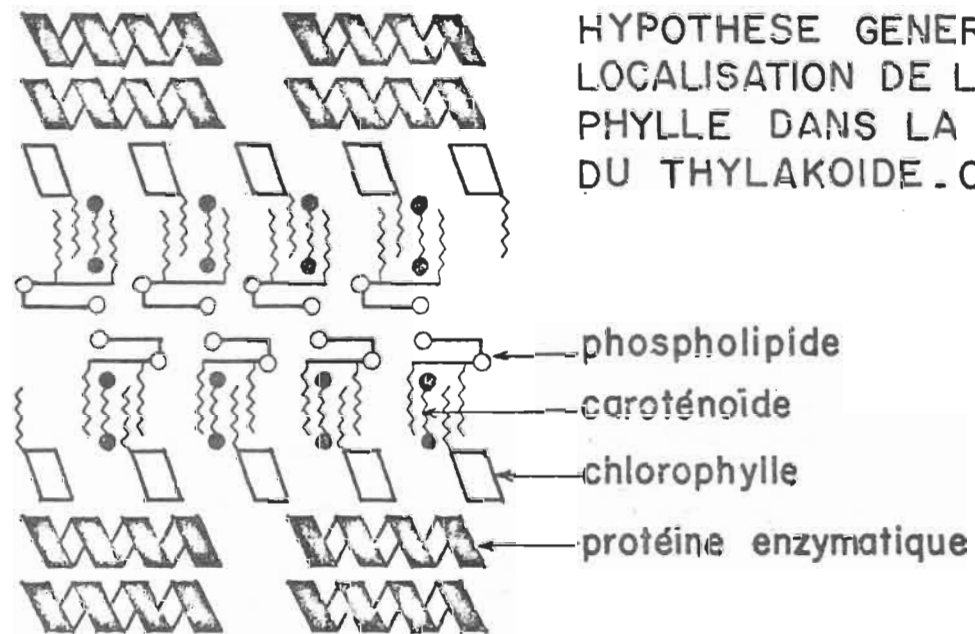
SCHEMA D'UN CHLOROPLASTE.
(ZEA MAÏS)

schéma 2



DISPOSITION RELATIVE DES COUCHES
PROTEIQUES, LIPIDIQUES ET DES PIGMENTS
DANS LES LAMELLES OU LES THYLAKOÏDES
MUHLETHALER - 1965.

schéma 3



comportement spectroscopique.

Comme, dans ce domaine, les résultats obtenus "in vivo" et en monocouches sont comparables et meilleurs que ceux obtenus en solution, un effort pour continuer les recherches dans cette voie se poursuit depuis.

Avant 1937, Hugues réalise des films monomoléculaires de différents composés, dont la chlorophylle a, dans une solution aqueuse tampon. Par la suite Sjoerdsma (11), Alexander (12), Langmuir et Schaeffer (13) apportent des renseignements significatifs sur le comportement de la chlorophylle à l'état semi-cristallin. Un peu plus tard, Jacobs et Rabinovitch (14), Trurnit (15), Colmano (16,17), pour n'en citer que quelques uns, fournissent une somme imposante de résultats sur lesquels nous baserons d'ailleurs nos données (18 à 29). Actuellement, les expériences qui se font dans le domaine des monocouches et relativement au comportement des chromatophores sont menées par les équipes de Gaines (18 à 20), Litvin et Gulyaev (21 à 23), Brody (24,25).

Parallèlement, l'étude des transferts d'énergie entre les divers pigments photosynthétiques a préoccupé plusieurs chercheurs depuis le début du siècle (28,29). Rideal, Mitchell, puis l'équipe de Gaines sont de ceux qui ont étudié les réactions photochimiques pouvant se produire en monocouche (30)

et surtout monocouche de chlorophylle a (31 à 35).

De là, deux explications ont pris d'ailleurs une extension plus grande pour décrire le mécanisme des processus primaires entre les composants du système photosynthétique. Il s'agit d'une part, d'un procédé semblable à celui décrit par Th.

Förster (36 à 40) et d'autre part, du phénomène de la photoconductivité tel que proposé par Katz (41), puis Rosenberg (42 à 44) et appuyé dernièrement par G. Komissarov (45) (voir aussi: 46 à 48).

Comme la dernière possibilité semble peu probable vu le faible pouvoir conducteur de la chl a et la trop grande énergie d'activation impliquée, nous ne la considérerons pas dans le présent travail.

I.2 Constitution Chimique

Nous parlerons surtout ici des deux pigments qui nous intéressent:

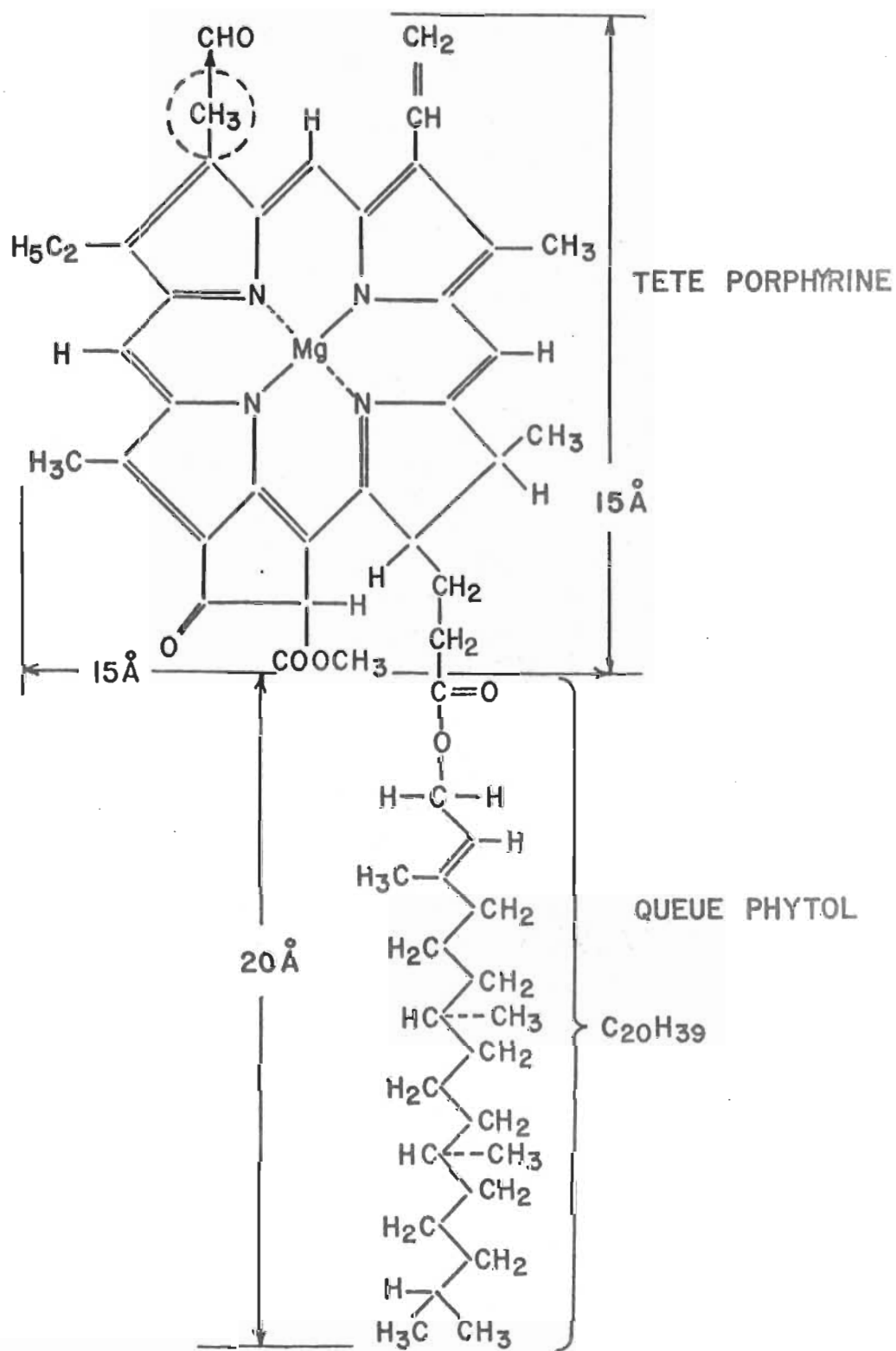
chlorophylle a, β -carotène.

I.2.1 chlorophylle a

Formule: $C_{55} H_{72} O_5 N_4 Mg$ (schéma 4)

C'est un dérivé de la porphyrine, système hétérocyclique composé de quatre anneaux pyrrole auxquels se rattache une "queue" phytol.

Les molécules de chl a sont plutôt lipophiles, mais



(D'après Wolken 1961)

CHLOROPHYLLE *a* $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$

elles contiennent des groupements polaires tels que le carbonyle et l'atome de magnésium central. (Ce dernier porterait d'ailleurs une charge fractionnelle positive, équilibrée par une charge négative équivalente répartie sur les quatre atomes d'azote autour de lui).

La longue chaîne phytol $C_{20}H_{39}$ (20 Å) attachée au système polycyclique de la porphine est strictement lipophile.

La molécule de chl a se présente donc comme constituée d'une tête porphine plus ou moins polaire et d'une queue apolaire.

Ces caractéristiques lui conféreraient la propriété de s'attacher par le noyau tétrapyrrolique aux molécules polaires comme les protéines, tandis que la chaîne hydrocarbonée se placerait dans un milieu lipophile.

Des calculs montrent qu'une telle disposition semble réalisable dans les thylakoïdes à condition que la molécule de chl a soit inclinée de 55° par rapport à la surface du granum. Cette orientation semble plus ou moins vérifiée comme le confirment les travaux de R. Olson et coll. "in vivo" par polarographie (49) et (50).

I.2.2 chlorophylle b

Formule: $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$

Elle diffère de la chl a par la seule substitution d'un

groupement aldéhyde $-CHO$, au groupement méthyle $-CH_3$ présent dans l'anneau pyrrole 3. (schéma 4)

Cette propriété lui confère une électronégativité légèrement supérieure à celle de la chlorophylle a dont elle semble d'ailleurs dériver (51 à 56).

I.2.3 Les caroténoïdes.

Il en existe au moins 180 sortes différentes dans la nature, parmi des végétaux aussi variés que les algues ou les fleurs. Ce sont des hydrocarbures à chaîne conjuguée linéaire, lipophiles et hydrophobes.

Les plus communs possèdent 9 ou 11 liaisons doubles conjuguées, certains ont quelquefois des fonctions alcools, ou cétones.

On les appelle généralement des polyènes, des terpènes, leur squelette étant constitué d'une manière courante de 40 atomes de carbone.

Les groupes terminaux de la chaîne polyénique peuvent être identiques ou différents: ce sont des furanoïdes, des époxydes par exemple.

Ils sont souvent instables aux acides, bases, et à l'air.

Exemples de caroténoïdes: β -carotène, lutéine, néoxanthine, violaxantine.

Le β -carotène est un caroténoïde cyclique (schéma 5) qui a un cycle β -ionone à chaque extrémité de la chaîne.

1.2.4 Les phycobilines.

Nous ne les mentionnerons que très brièvement puisqu'ils ne seront pas étudiés dans le présent travail.

Ce sont des pigments très abondants dans les algues où on les retrouve en remplacement (très souvent) des caroténoïdes.

Ces molécules contiennent, comme les chlorophylles, quatre noyaux pyrroles, (ne formant pas de cycle fermé); par contre elles sont dépourvues de magnésium et de la queue phytol.

Elles sont hydrosolubles.

1.3 Leur rôle dans la cellule végétale

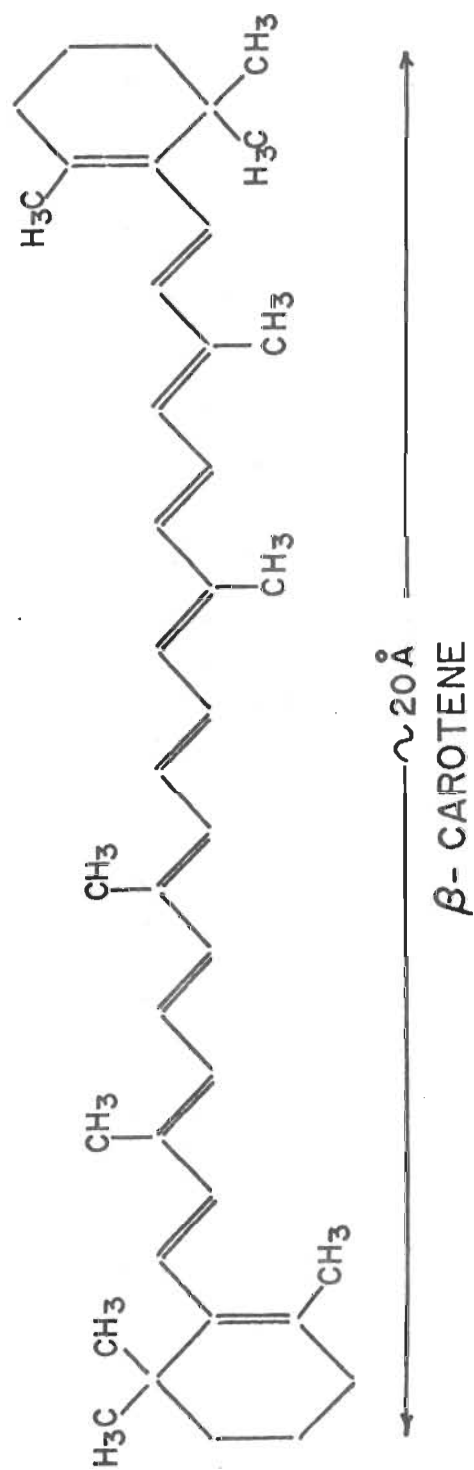
1.3.1 Généralités.

La concentration des pigments photosynthétiques, "in vivo", est élevée: approximativement 0.1 M. Néanmoins:

- il existe une faible évidence qu'il y ait formation de dimères
- et seulement 0.1% des pigments totaux sont photoactifs.

Les autres 99%, ont-ils un rôle prépondérant à jouer dans le transfert d'énergie: "Accepteurs (de lumière) - centre réactif"?

schéma 5



[chl a] . dans chloroplaste: 1×10^{-2} M

. dans thylakoïde: 1 M

Proportions des pigments dans une cellule végétale: (22,127)

1 caroténoïde : 5 chlorophylles (a + b)

1 caroténoïde : 3-4 chlorophylles a

et plus précisément:

1 β -carotène : 15 chlorophylles (a + b)

1 β -carotène : 9 chlorophylles a

(1 chlorophylle b : 2.3 chlorophylle a)

I.3.2 Les chlorophylles

Dans les organismes végétaux, la chlorophylle se présente sous deux formes suivant les molécules auxquelles elle est associé:

(54,55,56)

- chlorophylle lipoidique (3/4 chlorophylle totale)

(c'est-à-dire chlorophylle sinon associé aux lipides, du moins présente dans leur environnement) faiblement fluorescente (Rendement fluorescence: \approx 2%), photoactive.

- chlorophylle hydratée (1/4 chlorophylle totale)

fortement fluorescente.

Ces caractéristiques sont possibles si l'on se rappelle que la chlorophylle a tendance à s'attacher aux molécules polaires par sa tête porphine et aux couches lipoidiques par sa queue phytol.

In vivo, cela suggère que les molécules de pigments choisiront leur position dans le granum, entre les couches

protéiques polaires et les couches lipidiques.

Rôle de la chlorophylle "in vivo":

Il se borne à trois fonctions importantes:

- a) capter l'énergie lumineuse dans les régions du spectre comprises
 - dans le bleu, entre 400 et 500 nm
 - dans le rouge, entre 600 et 750 nm
- b) transmettre cette énergie à d'autres molécules de chlorophylle a qui à cause d'une disposition particulière ou d'une association spéciale jouent le rôle de "trappe" ou piège d'énergie.
 Cette forme spéciale de chlorophylle serait celle qui absorbe dans le rouge.
- c) au niveau des pièges d'énergie: assurer des réactions photochimiques conduisant à la libération de l'oxygène à partir d'une molécule d'eau. Lorsque cette énergie emmagasinée n'est pas utilisée chimiquement, elle se dégrade sous forme de chaleur ou de fluorescence.

I.3.3. Les caroténoïdes

Si la localisation de la chlorophylle dans le thylakoïde commence à se préciser (57), celle des caroténoïdes et des autres pigments accessoires, par contre, demeure obscure.

On a l'habitude de les représenter dans la couche

lipidique du granum, à côté et parallèlement à la queue phytol de la chlorophylle. Pourtant, il est à remarquer que la disposition relative des deux molécules reste encore inconnue et qu'il faudrait penser à un autre modèle, puisqu'ils existent en quantité aussi importante que les chlorophylles elles-mêmes et que leur autoassociation est plus grande que celle qui existe entre ces dernières (58).

Dernièrement, par une technique de spectropolarimétrie, Breton et Roux (59) ont entrevu la possibilité que les caroténoïdes soient orientés dans le plan de la lamelle. Leur grande diversité et leur concentration importante (cinq fois moins nombreux que les chlorophylles) sont des facteurs qui les rendent intéressants à étudier.

Comme nous le verrons plus loin, ils ont la propriété d'absorber la lumière à des longueurs d'onde relativement courtes: 380-550 nm (et plus précisément 480-500 nm).

La longueur d'onde et l'intensité de leurs bandes d'absorption croissent avec la longueur de leur chaîne (60).

Sans leur présence, la chlorophylle a, qui absorbe également dans cette région, serait irréversiblement photooxydée et dénaturée par l'oxygène (60, 61). Ils agiraient en "quenchant" l'état singulet et triplet de la chlorophylle avec d'autant plus d'efficacité que le nombre de leurs doubles liaisons conjuguées augmente (neuf double liaisons semblent

au moins nécessaires) (63 à 65).

D'autres rôles, non établis clairement, leur sont encore attribués:

- dans le phénomène de transfert d'énergie (66 à 69)
- et - comme molécules capables de catalyser des réactions chimiques en stabilisant des conformations protéiniques.

Dans le présent mémoire, nous porterons un intérêt particulier aux deux premières fonctions.

1.3.4 Les phycobilines

Ce sont les principaux pigments des algues vertes après la chlorophylle.

Moins connues encore que les caroténoïdes sont les régions où elles se localisent dans le chloroplaste.

Menke (69) les place à côté des caroténoïdes et de la queue phytol de la chlorophylle, dans la région lipophile de la membrane granaire.

Par contre, ces pigments existent, in "vivo", en liaison étroite avec les protéines. On n'a jamais pu jusqu'à présent séparer le chromophore de la protéine sans changer ses propriétés optiques et biologiques (60).

Il faut donc penser que dans le chloroplaste nous avons les trois couches suivantes:

- région lipidique où se concentrent les caroténoïdes
- région protéinique où se concentrent les phycobilines
- région intermédiaire où se place la chlorophylle.

Il est à remarquer que dans ces trois couches, les pigments ne doivent pas être situés loin les uns des autres, car comme nous l'avons déjà mentionné, l'énergie d'excitation des caroténoïdes et surtout des phycobilines doit se transmettre d'une manière efficace à la chlorophylle.

I.4 Propriétés photophysiques connues

I.4.1 Absorption et Fluorescence de la chlorophylle a

Une bibliographie imposante traduisant un travail énorme dans le domaine fournit de nombreuses informations (70 à 85).

Tableau 1: Absorption et fluorescence de la chlorophylle a sous différentes formes.

Etat de la chlorophylle	Absorption (max. nm)	Fluorescence (max. nm)
"in vivo"	432; 672-683-695	682-700; 722-728
en solution (ether)	430; 660	665
en monocouche	442; 675-680	678

Figures 1 et 3: Spectre d'absorption de la chlorophylle a et de divers pigments en solution.

Figures 2 et 4: "in vivo"

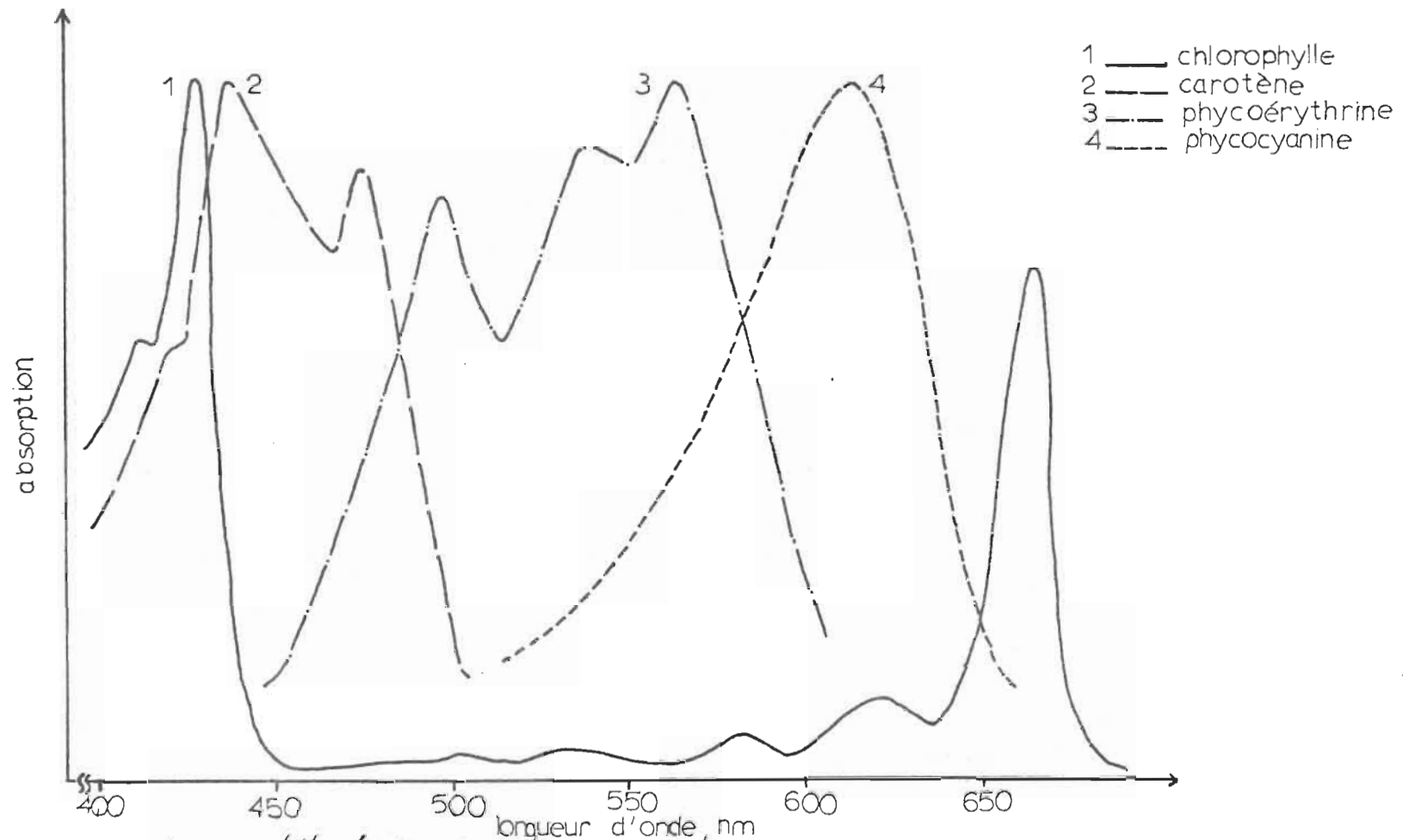
Figure 15 : en monocouche.

Réflexions à partir des spectres:

D'après la fig. 1: la chl. a est le pigment qui absorbe le plus loin dans le rouge, et un de ceux qui absorbe dès 400 nm.

D'après les cinq figures: "In vitro" et surtout en solution, il existe un déplacement hypsochrome des maxima d'absorption (par rapport à ce qui existe "in vivo"). On peut expliquer ceci comme résultant du fait, que dans le chloroplaste, la chlorophylle qui absorbe dans le rouge se présente sous diverses

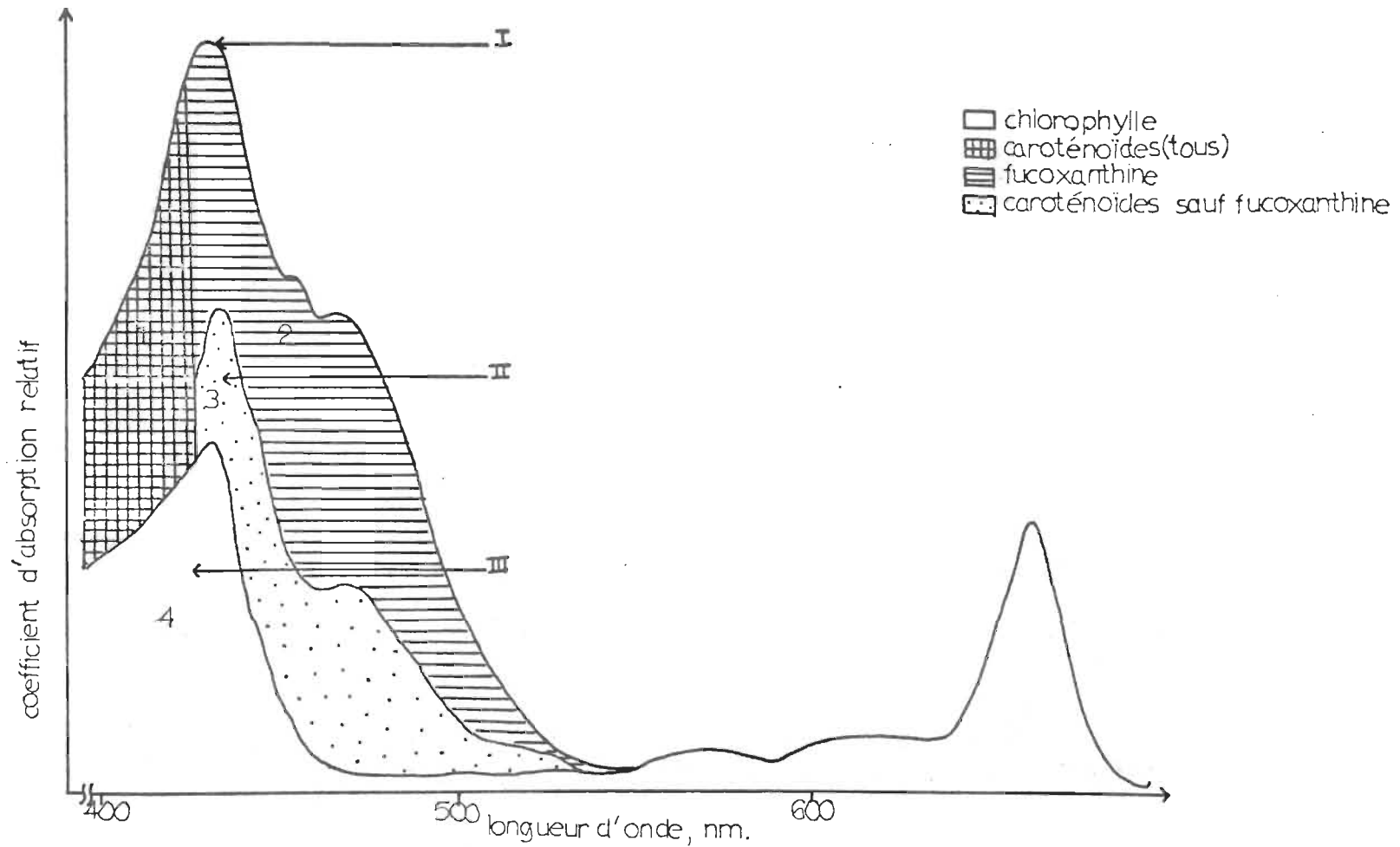
fig.1



Les courbes ont été réduites de sorte que le max. de chaque pigment ait la même hauteur.

SPECTRES d'ABSORPTION de DIVERS PIGMENTS (Rabinovitch, 1954.) (140)

fig:2



Courbe I : Totalité des pigments
 Courbe II : Chlorophylle a + caroténoïdes (sauf fucoxanthine)
 Courbe III : Chlorophylle g

DISTRIBUION de l'ABSORPTION parmi les PIGMENTS

fig.3

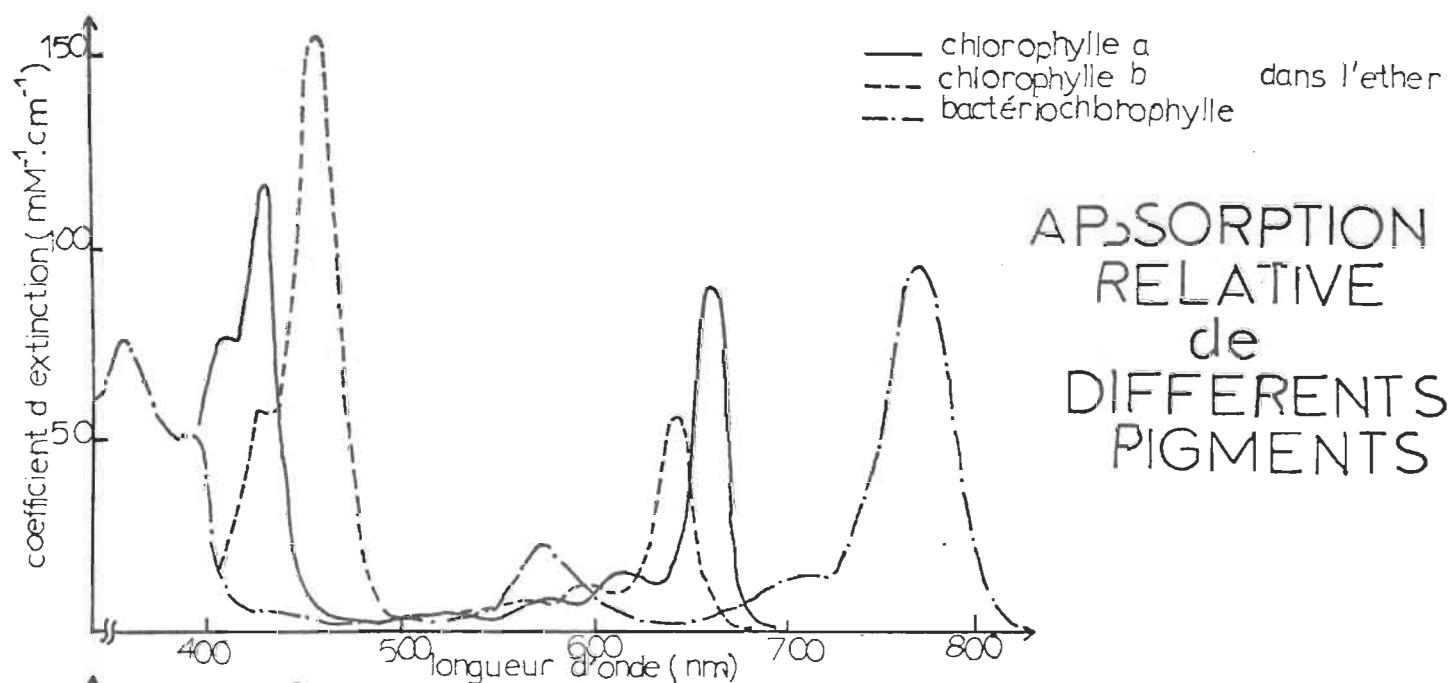
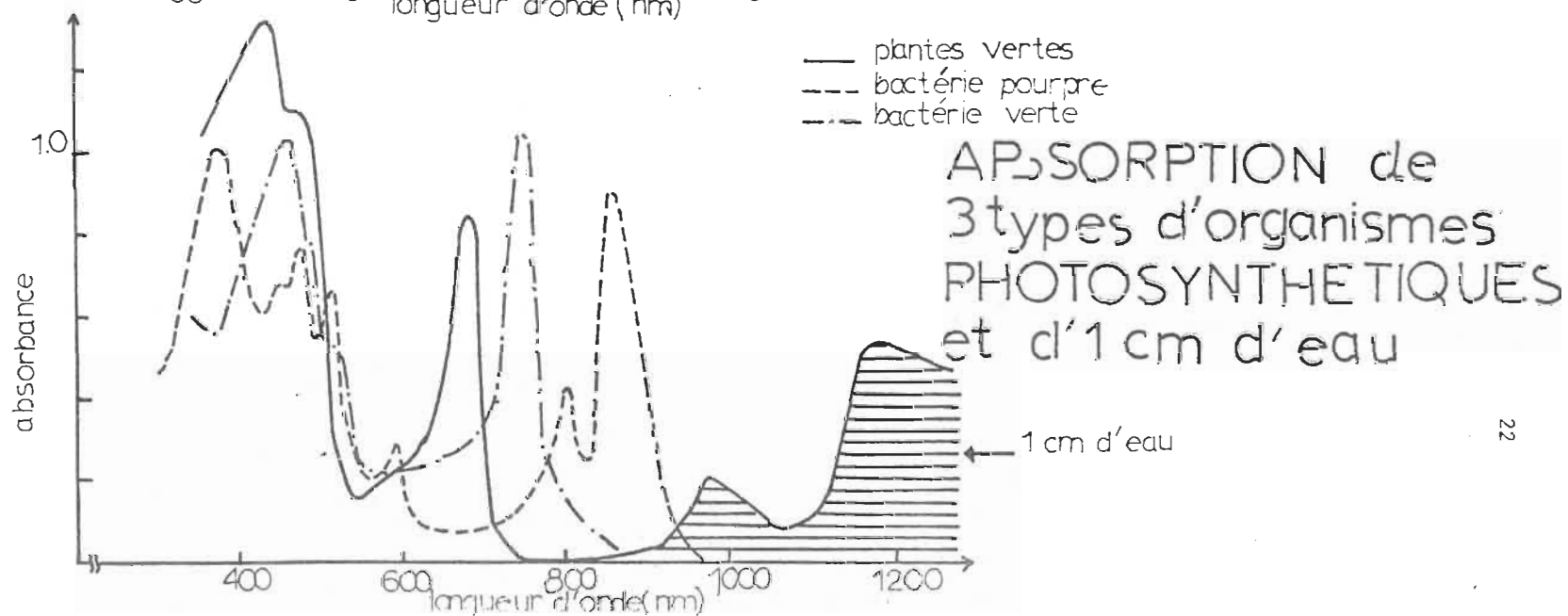


fig.4



formes d'association avec les protéines et/ou les lipides ce qui lui confèrerait des propriétés photophysiques un peu différentes.

Relativement aux propriétés d'absorption et de fluorescence de la chlorophylle a en présence de chl b et de pigments accessoires un phénomène supplémentaire se produit. Il s'agit de l'Effet Emerson.

L'Effet Emerson peut se traduire ainsi:

- a) La fluorescence de la chlorophylle a est accrue lorsqu'elle reçoit l'énergie à partir des pigments accessoires (87,88)
- b) Le taux de photosynthèse est plus grand que la somme de chaque taux de photosynthèse produit par un pigment particulier absorbant à une longueur d'onde précise.

Ce phénomène résulte de ce que l'on appelle "La fluorescence sensibilisée" preuve directe d'un échange de l'énergie électronique dans les cellules. Ceci a été mis en évidence pour la chlorophylle a "in vitro" (92) et "in vivo" (91) lorsque l'énergie d'excitation lui est transmise par des pigments aussi divers que la chlorophylle b, ou le fucoxanthol (89): caroténoïde absorbant dans la région "bleu-vert" du spectre, ou encore des phycobilines (90,91).

I.4.2 Processus photochimiques applicables aux chlorophylles

a) Réactions primaires

Population des états excités

L'absorption d'un quantum de lumière d'énergie $h\nu$, par une molécule de chl a dans la région des basses fréquences

du spectre (absorption) l'amène dans les niveaux vibrationnels les plus bas du premier état excité singulet.

Si le quantum possède une énergie supérieure il conduira la molécule dans des niveaux électroniques et vibrationnels supérieurs, toujours dans l'état singulet.

L'énergie est rapidement dissipée dans l'environnement sous forme de: - conversion interne vers le niveau le plus bas de S_1

A partir de S_1 , cette énergie peut se dégrader sous forme de:

- fluorescence
- conversion interne

jusqu'au niveau fondamental S_0

ou encore: - par "combinaison intersystème" jusqu'au niveau excité triplet le plus bas: T_1 .

Jusqu'à présent on n'a pas réussi à mettre en évidence cette propriété de la chlorophylle "in vivo": chl a à l'état triplet.

Par contre, de T_1 l'énergie peut encore être dégradée

- par un processus non radiatif jusqu'en S_0
- ou - à la suite d'une réaction avec une autre molécule.

b) Transfert d'Energie

Une molécule de chlorophylle excitée, dans l'état singulet ou triplet peut **perdre** son énergie par un transfert non radiatif à une molécule voisine suivant le mécanisme décrit par Förster et sur lequel nous reviendrons au chapitre suivant.

Dans ce cas, bien sûr, la chlorophylle peut elle-même recevoir de l'énergie provenant d'une autre molécule excitée.

1.4.3 Observations directes des Réactions Primaires impliquant la chlorophylle a.

Etat singulet

Il est mis en évidence par le phénomène de la fluorescence "in vivo" et "in vitro" (93). Après avoir absorbé l'énergie lumineuse dans la région des bandes Soret, la transition que subit la chl a vers des niveaux singulets, supérieurs à S_1 , l'amène dans un état excité. Dans ces niveaux, la conversion interne est très rapide: 10^{-11} sec., jusqu'au niveau d'énergie le plus bas S_{Soret} : $23,300 \text{ cm}^{-1}$. La désexcitation peut se poursuivre ensuite par une transition non radiative jusqu'en 0S_1 . De là, c'est par fluorescence et surtout par désexcitation non radiative que la chl a retourne à l'état fondamental (62).

L'énergie qu'absorbe la chlorophylle dans la partie rouge du spectre assure une transition $S_0 \rightarrow S_1$ (de type $\Pi-\Pi^*$) dans la molécule. Dans ces "niveaux" l'énergie se "dégradera", comme

mentionné plus haut, jusqu'en S_0 , mais avec la prépondérance du phénomène de la fluorescence, à moins qu'elle ne soit "quenchée" (94) (Le terme "quenching" signifiant ici une "diminution de la fluorescence").

- Rendement quantique de fluorescence

. (dans solvant polaire) (donc "in vitro"): $30 \pm 5\%$ (95)

."in vivo" $< 2\%$

- Temps de vie de fluorescence $\tau_{S_1} = 5.0 \pm 1.0 \times 10^{-9}$ sec (94,96)

- Temps de vie radiatif $: 15 \times 10^{-9}$ sec

- Energie du niveau singulet le plus bas : $13,300 \text{ cm}^{-1}$ (26,27,97,108)

Etat triplet

Il n'a jamais été mis en évidence "in vivo", même si son existence a été souvent suggérée pour expliquer la cinétique des réactions photochimiques (100, 101, 102). "In vitro", par photolyse éclair, R.S. Becker a mis la chl a à l'état triplet en évidence (103), bientôt suivi par Livingston (112, 113)

Différents niveaux triplets pourraient être peuplés après absorption de lumière si "la combinaison intersystème" de l'état singulet à l'état triplet était prépondérante. Les avis sur ce sujet sont très partagés (26, 92, 96, 103, 104).

En solution (dans du 3 méthyl-pentane) cet état est caractérisé par

- Temps de vie long $\tau_T > 0.5 \times 10^{-3}$ sec.

- Energie du niveau triplet le plus bas $- 9,900 \text{ cm}^{-1}$ (ou $10,250 \text{ cm}^{-1}$ (97, 104, 105))

au lieu de $18,500 \text{ cm}^{-1}$)(93).

Transfert d'énergie singulet-singulet

L'effet Emerson précédemment cité en est une preuve:

Dans la réaction: $M_1^* + M_2 \rightarrow M_1 + M_2^*$

Si M_1^* est une molécule excitée par l'absorption d'un quanta de lumière, et si elle est fluorescente (comme la chl b par exemple), le transfert d'énergie se manifeste par une augmentation de la fluorescence de M_2^* (chl a) au détriment de la fluorescence de M_1^* .

Ce mécanisme a été observé et très bien décrit par Duysens (91) entre autres, et Watson et Livingston (92).

Transfert d'énergie triplet-triplet

Un tel transfert sera possible si la deuxième molécule a un niveau triplet au moins aussi bas que celui de la chlorophylle a.

Or même pour une valeur aussi faible que $\approx 10,000 \text{ cm}^{-1}$ pour chl a à l'état triplet, il semble que les polyènes aient également des niveaux triplets d'énergie semblables. Si la valeur $11,050 \text{ cm}^{-1}$ attribuée au premier état triplet des polyènes est exacte (106, 107) un transfert dans le sens $^3\beta \text{ car} \rightarrow ^3\text{chl } \underline{a}$ devient possible.

Par contre si l'énergie du niveau triplet le plus bas du β car. est $9,700 \text{ cm}^{-1}$ un transfert en sens inverse est favorisé $^3\text{chl } \underline{a} \rightarrow ^3\beta\text{-carot.}$

De toutes façons, une différence aussi faible entre les divers niveaux triplets mentionnés, explique déjà assez bien le phénomène de "quenching" de l'état triplet de la chl a par le β -car. (105 à 113 et 118 à 124).

1.4.4 Propriétés photophysiques du β -carotène

"In vivo": Comme nous l'avons déjà mentionné, les caroténoïdes ont la propriété d'absorber l'énergie lumineuse entre 380-550 nm.

"In vivo", ces pigments photosynthétiques, absorbent deux fois plus que le chl a elle-même dans ces régions du spectre, et contribuent pour 30% (à 70%) dans le transfert d'énergie (63, 124, 125).
Figures 1, 2.

De plus, en quenchant l'état triplet de la chl a d'une manière efficace, le β -carotène est un pigment essentiel protégeant la chlorophylle contre une photooxydation irréversible. Par ses propriétés photophysiques, il se trouve donc être un donneur aussi bon qu'accepteur dans la chaîne du transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques (113 à 118).

Zones d'absorption des divers pigments

chl <u>a</u>	: 380 - 440 nanomètres
chl <u>b</u>	: 420 - 480

caroténoïdes	: 400 - 500 nanomètres
phycoerythrine	: 460 - 590
phycocyanine	: 550 - 640
chl <u>b</u>	: 630 - 655
chl <u>a</u>	: 645 - 680

L'interaction chl a - β -carotène qui peut conduire au transfert d'énergie entre les 2 molécules (127, 130) et au quenching de la chl a par le β -carotène (références citées plus haut) se traduit également, d'après H. Claes et T.O.M. Nakayama, par une photoisomérisation du caroténoïde (111).

Propriétés photophysiques du β -carotène - Observations directes.

"In vitro": En solution dans l'éthanol, le β -carotène absorbe entre 400 à 500 nm avec deux maxima: 440 et 480 nm (voir fig. 1)

Suivant la configuration chimique de la molécule (forme cis ou trans) les maxima seront déplacés vers les longueurs d'onde plus ou moins courtes.

Par exemple, dans un solvant comme l'hexane, le maximum situé à 480 nm pour la forme trans du β -carotène se déplace vers les courtes longueurs d'onde: 338 nm pour la forme cis.

Nous remarquons tout de suite que la moitié (400 à 450 nm) de sa zone d'absorption correspond à une région du spectre

d'absorption de la chlorophylle a, elle-même. C'est dire que dans cette zone, l'étude des transferts d'énergie entre les deux molécules devrait inclure des phénomènes de quenching.

En effet une étude des niveaux énergétiques singulet et triplet de la molécule et de l'énergie correspondante indique que le β -carotène est un quencher efficace de l'état triplet et même singulet de la chl a.

Energie du niveau singulet le plus bas: $\begin{cases} 17,000 \text{ cm}^{-1} \\ \text{à } 18,000 \text{ cm}^{-1} \end{cases} \text{ (109) (131, 132)}$

Temps de vie de l'état excité singulet: 3×10^{-6} sec.

Energie du niveau triplet le plus bas: Elle n'a pas été définie clairement. Plusieurs valeurs sont disponibles variant entre $9,700 \text{ cm}^{-1}$ et $17,050 \text{ cm}^{-1}$ (109, 110, 118 à 120).

Temps de vie de l'état excité triplet: 9 μ sec. (133).

N.B.: On n'a jamais pu mettre en évidence une fluorescence possible du β -carotène autant "in vivo" qu'"in vitro".

CHAPITRE II

MECANISME DE TRANSFERT D'ENERGIE D'EXCITATION INTERMOLECULAIRE

II - MECANISME DE TRANSFERT D'ENERGIE D'EXCITATION INTERMOLECULAIRE

II.1 Considérations générales - Théorie de Th. Förster

Concernant le problème sur lequel nous nous penchons: Transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques, un travail considérable et des hypothèses non moins nombreuses ont été soumis depuis le début du siècle (35 à 40) (133 à 139). Néanmoins c'est à la suite de travaux publiés par F. Perrin, vers 1930, (137), puis par S.I. Vavilov en U.R.S.S. (138, 139) et enfin par Th. Förster en Allemagne (36 à 40, 133, 134) que certains éclaircissements sont apparus concernant le processus photophysique lui-même. Jusqu'à cette date, les résultats de Frank-Condon relatifs aux transferts d'excitation entre molécules identiques ne donnaient pas d'explications satisfaisantes au processus de migration d'énergie dans le thylakoïde. Par contre la voie du transfert d'excitation par résonance était ouverte: avec l'étude des transferts d'énergie entre deux types différents de molécules, les couplages "pigment accessoire/chl a" et par extension "chl a/chl a" deviennent plus compréhensibles.

Dans le chloroplaste, qui ne peut être considéré comme un simple système chimique dans lequel les transferts d'énergie par diffusion de molécules ou de radicaux seraient possibles, le mécanisme de propagation de l'énergie est très complexe. Un thylakoïde est un milieu biologique qui a,

comme caractéristique d'être fermé et isothermique. Ceci implique que l'énergie qui pourrait se transmettre d'une molécule à l'autre est faible: Elle est non seulement inférieure à l'énergie d'ionisation des molécules du système, mais également inférieure à l'énergie de dissociation de leurs liens chimiques. Nous devons considérer aussi un phénomène additionnel qui survient quand les molécules de la matière absorbante sont présentes en concentration élevée comme c'est le cas dans la cellule vivante. Dans ces conditions, les molécules peuvent réagir entre elles pendant la période de leur excitation ou par diffusion et collision cinétique ou par résonance. "In vivo", la concentration des pigments photosynthétiques peut dépasser 1×10^{-2} M, et leur nature même favoriserait un transfert d'énergie par résonance sans nécessiter d'électrons ou de radicaux libres comme transporteurs. L'énergie se transmettrait d'une molécule à l'autre jusqu'à un système "trappe" à partir duquel elle est émise sous forme de fluorescence si elle n'est pas utilisée chimiquement.

La conséquence la plus importante de cette proximité mutuelle des molécules de pigments est la possibilité d'un échange d'excitation électronique par résonance. Quand une molécule excitée par l'absorption d'un photon se trouve pendant la durée de cette excitation voisine d'une autre molécule capable d'absorber le même quantum d'énergie élec-

tronique - molécule en résonance avec la molécule excitée - l'énergie d'excitation peut être échangée entre les deux partenaires.

Un exemple de résonance mécanique très simple peut nous donner une idée assez précise de la situation: celui de deux cloches ayant la même fréquence de vibration. "Si l'on frappe l'une d'elles, l'autre commence bientôt à vibrer également, l'énergie d'excitation étant transmise par l'intermédiaire de l'air. Si maintenant, les deux cloches sont couplées fortement - en étant suspendues à la même barre par exemple - on remarque que la première cloche peut transmettre toute son énergie de vibration à la seconde: la première cloche devient muette, et la deuxième vibre aussi fortement que la première au début. Si le couplage n'est pas interrompu jusqu'à la fin de l'échange, le phénomène se reproduit, l'énergie de vibration retournant à la première cloche et la seconde devenant muette à son tour" (140).

Un échange d'énergie comparable doit avoir lieu entre les molécules "résonantes" de pigments photosynthétiques voisins, le champ électromagnétique des électrons fonctionnant comme moyen de couplage. Cet échange d'énergie entre deux éléments peut être étendu à la possibilité de migration de l'excitation dans une chaîne ou un réseau de molécules résonantes, sur des distances de l'ordre de 50 à 100 Å., car si la migration est "lente", c'est-à-dire si la durée de séjour de l'excitation

dans chaque molécule de pigment est longue devant la période de vibrations moléculaires, les noyaux atomiques entrent en vibration (principe de Franck - Condon conservé) l'un après l'autre. Le spectre d'absorption de la chlorophylle "in vivo" indique par sa similitude avec le spectre de la chlorophylle en solution diluée que les molécules du pigment ne forment pas un système à échange d'énergie rapide mais plutôt "lent". La même remarque s'applique aux caroténoïdes et conformément aux prévisions théoriques, l'échange d'énergie se dirige toujours vers le pigment qui absorbe le plus loin, dans le rouge, c'est-à-dire la chl a dans le cas des plantes vertes. Comme nous l'avons déjà relevé, il est intéressant de noter que la chl a absorbe dans les longueurs d'onde les plus courtes mais aussi dans les longueurs d'onde les plus grandes (fig. 1).

II.2 Principes généraux de transfert par résonance

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment dans l'Effet Emerson, la fluorescence de la chl a peut être induite à partir de molécules de nature différente. Il faut donc admettre que l'énergie lumineuse absorbée par une certaine molécule D (donneur) à une longueur d'onde λ_1 est transmise à la molécule A (accepteur) qui a alors la possibilité de fluorescer à la longueur d'onde λ_2 (avec $\lambda_2 > \lambda_1$).

Vu la faible énergie disponible "in vivo", pour assurer un tel phénomène, il y a de très fortes chances que le mécanisme fasse intervenir un transfert d'énergie d'excitation électronique (plutôt qu'un transfert de charges).

La signification de "transfert d'énergie d'excitation" telle qu'employée en Photochimie consiste en un transfert d'énergie d'une molécule excitée à une autre qui ne l'est pas. Dès lors, deux cas distincts sont à considérer:

- 1) l'accepteur d'énergie peut être amené dans un état électronique excité
- ou 2) l'énergie peut être donnée à un système "receveur" sous la forme d'énergie rotationnelle, vibrationnelle, translationnelle.

Comme il s'agit pour nous d'expliquer la fluorescence sensibilisée de la chlorophylle, c'est-à-dire une désexci-

citation radiative, nous nous intéresserons essentiellement aux cas où l'énergie est transférée en tant qu'énergie électronique (cas:1).

Pour qu'un tel transfert soit possible, la concentration des molécules doit être relativement élevée afin que la distance entre les donneurs - accepteurs de la chaîne soit faible, or cela semble être le cas puisque la concentration des pigments dans le chloroplaste est aussi élevée que 0.1 M.

II.2.1 Transfert d'énergie électronique:



où dans l'état initial: D(donneur) a déjà été excité; D^*

dans l'état final: D est retourné dans un état électronique inférieur.

: A (accepteur) est passé dans un état électronique excité.

L'énergie électronique transférée est identifiée par l'astérisque: *

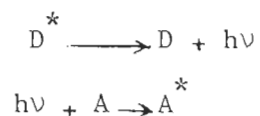
Ce processus de transfert d'énergie, après absorption d'un photon par le donneur, peut s'effectuer de deux manières:

- transfert d'énergie radiatif
- transfert d'énergie non radiatif.

Dans le dernier cas, une interaction directe entre le donneur excité et l'accepteur est nécessaire.

a) Transfert d'énergie radiatif:

Il fait intervenir la possibilité de réabsorption par A de l'émission du donneur D. Deux étapes, avec la collaboration d'un photon, se succèdent:



Dans ce cas, il n'existe pas d'interaction directe Donneur - Accepteur. Seules les énergies correspondantes dans les spectres d'émission du donneur, et d'absorption du receveur (recouvrement des spectres) peuvent être transférées.

L'efficacité de transfert dépend:

- . du rendement quantique de fluorescence de D
- . de la loi de Beer - Lambert concernant l'absorption par l'accepteur.

Ce transfert peut avoir lieu sur de grandes distances (de l'ordre des diamètres moléculaires) et la probabilité que la molécule accepteur A absorbe la lumière émise par le donneur D, situé à une distance R, varie comme $\frac{1}{R^3}$.

Le transfert d'énergie radiatif est caractérisé par l'invariabilité du temps de vie du donneur; il est de faible importance quand les molécules accepteur et donneur sont identiques, à cause du faible recouvrement des spectres.

Nous n'insisterons pas davantage car il apparaît immédiatement que cette explication n'est pas suffisante, puisque dans le cas des pigments photosynthétiques, les caroténoïdes qui absorbent dans des longueurs d'onde plus courtes que la chlorophylle ne sont pas fluorescents, d'où impossibilité d'une réabsorption quelconque par la chl a.

Par contre,

Nous porterons une attention particulière sur les transferts d'énergie non radiatifs dans lesquels:

- le donneur et l'accepteur sont des espèces chimiques différentes ou semblables situés dans un milieu condensé ou désordonné.

quand - une des espèces peut émettre de la lumière (chl a)

- les états électroniques excités des deux espèces considérées sont peu énergétiques, de manière à ce que, en général, les vitesses de transfert d'excitation soient faibles comparées aux vitesses de relaxation vibrationnelle du donneur et de l'accepteur.

L'hypothèse d'un tel processus dans notre système est d'autant plus probable que les molécules qui le constituent sont présentes à des concentrations suffisantes et que leurs niveaux énergétiques des états excités sont peu élevés, comme nous l'avons indiqué. (paragraphe L.4)

b) Transfert non radiatif

ou appelé encore: "Transfert par résonance induite".

C'est celui qui est responsable de l'effet appelé "fluorescence sensibilisée", phénomène souvent mentionné lorsqu'il s'agit de systèmes biologiques et conséquemment de l'appareil photosynthétique.

Il fait intervenir la désexcitation simultanée du donneur avec l'excitation de l'accepteur, processus à une seule étape ne nécessitant pas de réémission intermédiaire de lumière.

Une interaction entre donneur et accepteur est nécessaire et les transitions dans le donneur et l'accepteur doivent être de même importance.

Un transfert réel peut se produire même si l'interaction Donneur - Accepteur est faible, de sorte que des transferts sur de longues distances (50 et même 100 Å) deviennent plausibles. L'énergie d'excitation peut être transmise sans grande diminution entre des molécules de chlorophylle semblables et entre les types différents, chl b → chl a, β-carotène → chl a, ...

II.2.2 Considérations générales sur le transfert d'énergie par résonance.

Parler de transfert d'énergie entre deux (ou plusieurs) molécules suppose que l'une d'elle soit sous forme excitée

et l'autre non.

De là, si: . la distance qui les sépare,

. l'interaction qu'elles **exercent** l'une sur

l'autre, sont convenables,

l'énergie d'excitation électronique de la première se transmettra à la seconde.

N.B.: L'énergie d'interaction moléculaire est nécessairement faible puisqu'il s'agit, d'une énergie d'excitation électronique, la seule à ne pas être dissipée dans une réaction quelconque "in vivo".

Transitions couplées:

Dans tous les mécanismes qui seront considérés ici, une

résonance entre les états $D^* + A$ initial

et $D + A^*$ final

est nécessaire. Ceci est vérifié si la transition $D \longrightarrow D^*$ dans le donneur et la transition $A \longrightarrow A^*$ dans l'accepteur sont du même ordre de grandeur au point de vue énergie. A ce moment là, le transfert d'excitation correspond à la création de deux transitions couplées.

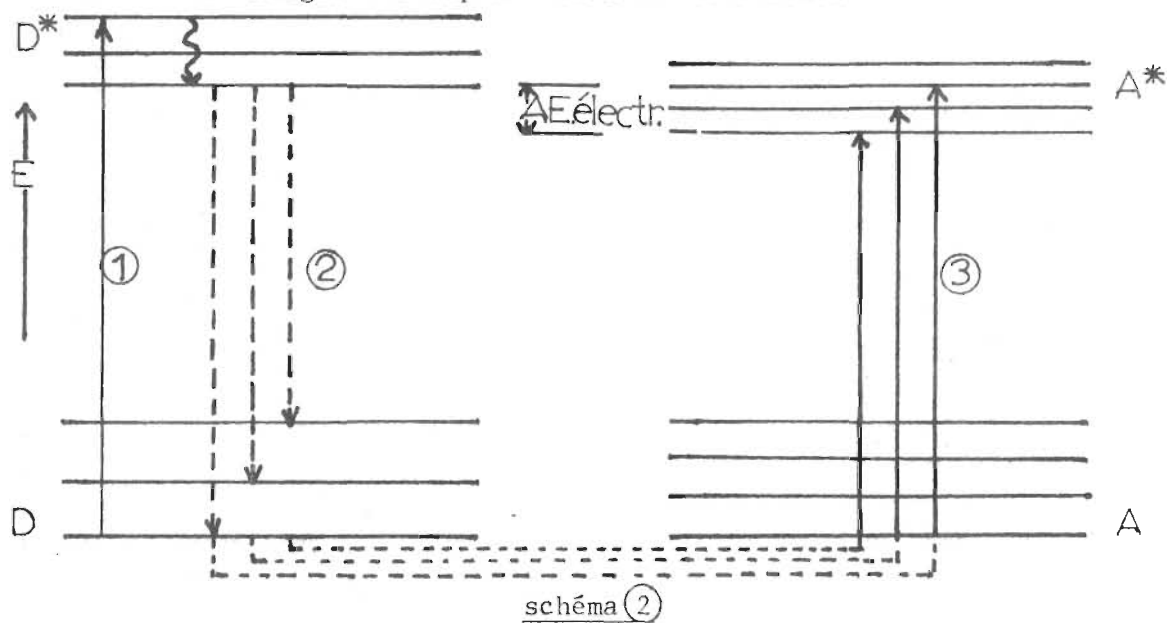
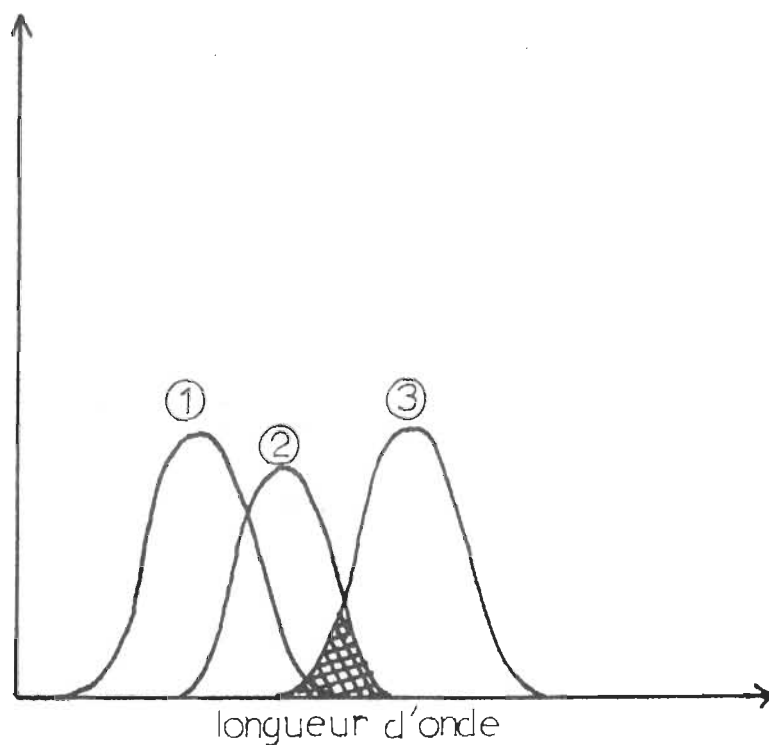
Schémas: ① et ②

Si le transfert d'énergie est plus lent que le temps de relaxation vibrationnelle de l'état excité de D et si la température n'est pas élevée, l'état initial a les deux molécules D^* et A dans des états vibrationnels très peu énergé-

schéma (1)

Transitions couplées :

Cas où le transfert se fait entre 2 molécules dont les niveaux d'énergie correspondants sont différents:

Spectroscopiquement:

① Absorption de D

② Emission de D

③ Absorption de A

xxxxx Recouvrement des spectres

tiques.

Si de plus, le transfert est vertical (suivant le principe de Franck - Condon), l'énergie transférée correspondra à une fréquence commune dans le spectre d'émission de D et d'absorption de A: (région de recouvrement).

Lorsque le recouvrement augmente, le nombre de transitions couplées permises augmente également, et par conséquent la probabilité de transfert d'excitation aussi.

L'intégrale de recouvrement est définie par:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\nu) \cdot \epsilon_A(\nu) d\nu$$

où $F_D(\nu)$ = distribution spectrale de l'émission de D exprimée en quanta et normalisée à 1.

$\epsilon_A(\nu)$ = distribution spectrale de l'absorption de A exprimée en quanta et normalisée à 1

J est une mesure du nombre possible d'états finaux, qui tient compte des facteurs de Franck - Condon.

- Interaction Donneur-Accepteur

Le transfert d'excitation, non radiatif ne peut avoir lieu que si les états

- initial $D^* + A$

et - final $A^* + D$

sont dégénérés (ou presque) et s'ils sont couplés par une énergie d'interaction U convenable. Le mécanisme de l'interaction peut s'expliquer de la manière suivante:

Dans un premier temps une molécule D à l'état fondamental (β -carotène par exemple) absorbe un quantum $h\nu$. Si l'énergie captée n'est pas importante au point de scinder la molécule en radicaux, ou de briser certains liens chimiques, cette énergie mènera D à un niveau énergétique singulet excité. Dans cet état, D^* aura des énergies vibrationnelles et rotationnelles telles que, s'il existe une deuxième molécule A , à l'état fondamental, voisine de D , elle va être perturbée par les oscillations auxquelles D est soumise.

De plus lorsque l'électron de D , après avoir été déplacé, retourne à un niveau inférieur, la radiation électromagnétique qui l'accompagne peut être transmise à la molécule voisine A . Comme l'amortissement de la radiation est très faible (la désactivation se produit après 10^{-8} sec, tandis que les mouvements des électrons ont lieu dans 10^{-15} sec), ceci nécessite seulement une interaction modérée.

L'interaction totale U est donnée comme l'élément matriciel d'une perturbation entre les états initial et final et inclue toutes les interactions électrostatiques des électrons

et du noyau du donneur D, avec celles de l'accepteur.

Notamment, nous retrouverons un terme de Coulomb:

L'interaction dipôle-dipôle dans la formule, peut être obtenue expérimentalement à partir des spectres d'absorption et d'émission.

II.3 Trois types d'interaction moléculaire: couplages fort, moyen, faible.

II.3.1 Transfert via l'interaction dipôle-dipôle. (voir tableau ②)

C'est ce mécanisme qui a été décrit par Förster, Dexter, Robinson. Sans vouloir entrer dans le détail de la théorie, notons quand même que la constante de vitesse pour un transfert d'excitation dans lequel des états initial et final sont couplés est de la forme suivante:

$$k_{D \rightarrow A}^* (\text{dipôle-dipôle}) = \frac{2\pi \cdot C}{h} \cdot \frac{f_D \cdot f_A}{R^6 \cdot \bar{\nu}^2} \cdot \theta \cdot (D^2) \cdot J$$

où f_D, f_A = force des oscillateurs dans les transitions du donneur D et de l'accepteur A.

$\bar{\nu}$ = fréquence moyenne ou nombre d'onde moyen

J = intégrale de recouvrement

$\theta(D)$ = dépendance angulaire de l'interaction dipôle-dipôle

C = constante

R = distance intermoléculaire

h = constante de Planck

Tableau: ②

Caractéristiques sur le transfert intermoléculaire de l'énergie d'excitation telles que décrites par Th. Förster
pour deux paires de molécules.

τ_T = Temps de transfert moyen entre les deux paires de molécules

$\tau_T < \tau$ temps de vie de l'excitation dans l'état singulet

U = Energie d'interaction dipôle-dipôle

C = Concentration de la solution de pigments donnant les valeurs moyennes τ_T et U pour les transitions fortes permises

R = Distance intermoléculaire

λ = Longueur d'onde.

Tableau (2) : Caractéristiques des trois types de couplage dans la théorie de Th. Förster

Mécanisme de transfert		Ordres de grandeurs approximatifs de:				Dépendance de la vitesse de transfert sur:		
Type	Description	τ_I (sec)	U (cm ⁻¹)	C(M)	R (Å)	R	λ	Température
Rapide	Couplage fort Energie délocalisée	$< 3 \times 10^{-14}$	> 1000	> 5	< 5	R^{-3}	Légère	
Moyen	Couplage moyen Energie plus ou moins délocalisée	$3 \times 10^{-14} - 3 \times 10^{-12}$	10-1000	0.1-5	5-20	R^{-3}	Légère	Légère
Lent	Couplage faible Energie délocalisée	$3 \times 10^{-12} - 3 \times 10^{-8}$	0.1-10	$3 \times 10^{-4} - 0.1$	20-100	R^{-6}	Nulle	Moyenne

On voit bien que $k_{D \rightarrow A}^*$ dépend directement de l'énergie d'interaction: U mise en évidence par J , de l'orientation mutuelle des dipôles, et de la distance qui les sépare.

Suivant la distance intermoléculaire, l'énergie d'interaction U varie considérablement, et trois cas doivent être considérés (schéma ③).

- $|U| \gg \Delta\epsilon \gg \Delta\epsilon' =$ Forte interaction ou "couplage fort"
- $\Delta\epsilon \gg |U| \gg \Delta\epsilon' =$ Interaction moyenne ou "couplage moyen"
- $\Delta\epsilon \gg \Delta\epsilon' \gg |U| =$ Interaction faible ou "couplage faible"

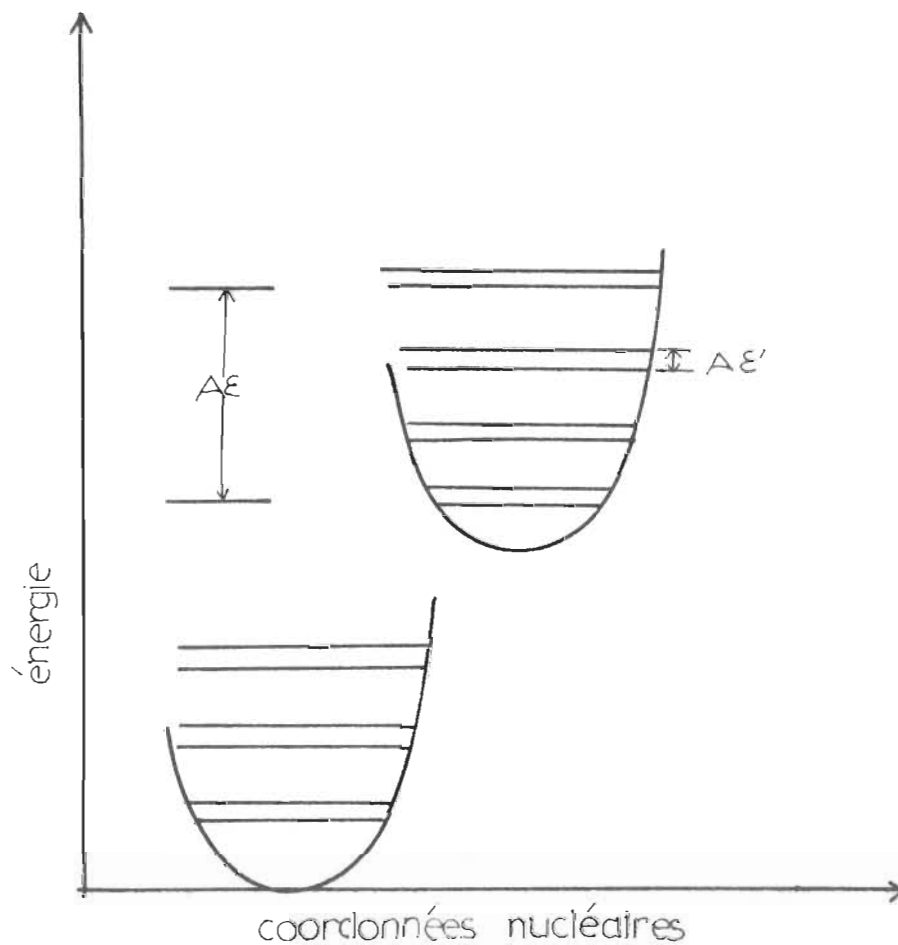
N.B.: $|U|$ n'est pas mesurable, mais elle peut être évaluée par rapport à

$\Delta\epsilon =$ Energie de Franck-Condon: différence entre les configurations d'équilibre des noyaux à l'état fondamental et à l'état excité.

$\Delta\epsilon' =$ largeur d'un niveau vibronique individuel
voir schéma: ③

Comme "in vivo" l'énergie d'interaction est de l'ordre de 30 cm^{-1} , parmi les 3 cas mentionnés ci-dessus, une situation intermédiaire entre le deuxième cas et le dernier, semble la plus adaptée à notre système photosynthétique.

schéma (3)



Ordres de grandeur pour une molécule aromatique:

$$\Delta\epsilon \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$$

Energie des quanta libres: 1000 cm^{-1}

$$\Delta\epsilon' \sim 10 \text{ cm}^{-1} \text{ avec } \tau = 3 \times 10^{-12} \text{ sec.}$$

Période d'une oscillation nucléaire $\approx 3 \times 10^{-14} \text{ sec.}$

D'ailleurs l'analyse des spectres d'absorption et d'émission montre qu'il n'existe pas d'altération de structure comme ce serait le cas dans l'hypothèse d'un couplage fort.

II.3.2 Couplage fort

Nous mentionnerons brièvement, quelles en sont les caractéristiques:

- . $|U| \gg \Delta\epsilon \gg \Delta\epsilon'$
- . énergie d'interaction "délocalisée" sur l'ensemble des 2 molécules D et A
- . Vitesse de transfert "élevée": Le transfert s'effectue pendant l'intervalle de temps T
- . Altération complète des spectres d'absorption et de fluorescence

N.B.: $T = \text{période de vibration de } D^*$

II.3.3 Couplage moyen

C'est le cas qui se présente lorsque l'interaction U entre les deux molécules D et A est inférieure à l'énergie d'interaction intramoléculaire entre noyau et électron, $\Delta\epsilon$. A ce moment là, à la suite de l'excitation, des noyaux subissent plusieurs vibrations autour de leurs nouvelles positions d'équilibre avant que le transfert soit possible

et la résonance n'existe seulement qu'entre les niveaux vibrationnels individuels des deux molécules

$$\rightarrow \Delta\epsilon \gg |U| \gg \Delta\epsilon'$$

- . Excitation électronique plus localisée que dans le cas précédent

- . Vitesse de transfert moins grande

Le transfert se produit pendant l'intervalle de temps T' (période de relaxation)

- . Faible altération de la structure des spectres

II.3.4 Couplage faible

Les conditions qui déterminent l'existence d'un tel couplage sont les suivantes:

L'énergie d'interaction $|U|$ est inférieure à $\Delta\epsilon'$, et avec cette énergie de couplage aussi faible, la condition pour que la résonance existe est encore plus stricte. Seules quelques petites régions de bandes correspondantes entre D et A sont en résonance, même si elles coïncident.

Finalement, la largeur de bande $\Delta\epsilon$ devient essentielle et les propriétés du système diffèrent des cas précédents: le transfert ne peut être qu'une transition non radiative entre les deux configurations (c'est-à-dire: Résonance inductive)

Dans des conditions de couplage très faible, une molécule excitée n'a pas que quelques vibrations, elle occupe également différents niveaux vibrationnels avant qu'un transfert se produise. Dans ce cas on préfère considérer cette excitation comme temporairement localisée sur une seule molécule, puisque le transfert est lent. Au niveau des spectres: Une faible interaction ne mène pas à une différence significative entre les spectres d'absorption du système et de ses composants, non plus d'ailleurs que dans les spectres de fluorescence. En effet, dans un spectre avec des structures vibrationnelles tous les "splittings" imaginables sont tellement petits qu'ils sont masqués par la "diffusion" des bandes vibrationnelles.

Par l'étude des spectres nous serons en mesure de déterminer quelle est la distance R entre les deux molécules: Donneur et Accenteur dans le cas d'une interaction faible, ou encore quelle est la vitesse du transfert de l'excitation.

Vitesse de transfert M_T :

$$M_T = \left[\frac{9K^2 \cdot \ln 10}{128\pi^5 \cdot m^4 \cdot N' \cdot \tau_d} \right] \left[\frac{1}{R^6} \right] \left[\int f_D(\bar{\nu}) \cdot \epsilon_a(\nu) \cdot \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \right]$$

où K = facteur numérique qui dépend de l'orientation mutuelle
des deux molécules

m = indice de réfraction

N' = nombre de molécules par millimole

τ_d^i = temps de vie intrinsèque de l'état excité du Donneur

$\bar{\nu}$ = nombre d'onde

$\epsilon_a(\bar{\nu})$ = coefficient d'extinction molaire de l'accepteur

$f_D(\bar{\nu})$ = spectre d'émission du donneur mesuré en quanta/
intervalle de nombre d'ondes.

l'intégrale représente le recouvrement du spectre d'absorption du receveur par le spectre d'émission du donneur.

Le transfert d'excitation dans de telles conditions est souvent appelé transfert dipôle-dipôle sur de longues distances parce que c'est le seul type de transfert long non radiatif qui en une seule étape se produit dans des dimensions supérieures à celles de la molécule et pendant la durée τ du temps de vie du donneur à l'état excité.

Un transfert d'énergie ayant les mêmes caractéristiques peut se produire en plusieurs étapes, si la densité des molécules est assez élevée et si les molécules sont de même nature comme c'est le cas dans le système photosynthétique

considéré ;
et

{	β -carotène	- chl <u>a</u>
	chl <u>a</u>	- chl <u>a</u>

La quantité d'énergie transférée correspond à une transition, d'un niveau vibrationnel excité (le plus bas de l'état singulet) vers le niveau fondamental et le temps nécessaire pour assurer un tel transfert est grand comparé à la période de relaxation des molécules excitées.

II.4 Type d'interaction applicable aux pigments photosynthétiques

Comparaison avec le système biologique considéré :

Nous avons déjà mentionné que ce qui caractérisait le système photosynthétique, dans lequel un transfert d'énergie d'excitation électronique pouvait avoir lieu entre le β -carotène et la chlorophylle a, se résume aux éléments suivants :

- . Système fermé, isothermique
- . Concentration des molécules de pigments assez élevée de sorte que
- . la distance intermoléculaire entre le donneur et l'accepteur est de l'ordre de 50 à 100 Å (pigment 1 - pigment 2 = 50 Å) (133)
(chl a - chl a = 70 Å)
- . Energie d'interaction suffisamment faible pour ne pas être utilisée dans une quelconque réaction chimique : 30 cm^{-1}
- . Niveaux d'énergie singulets et même triplets du même ordre de grandeur, mais avec l'avantage :

$$\begin{array}{ll} {}^0S_1 & \beta\text{-carotène: } 18,000 \text{ cm}^{-1} \text{ (et } {}^0_1T \approx 11,000 \text{ cm}^{-1}) \\ {}^0S_1 & \text{chl } \underline{a} : 13,300 \text{ cm}^{-1} \text{ (et } {}^0_1T \approx 10,000 \text{ cm}^{-1}) \end{array}$$

schéma: (4) (fourni pour propriétés photophysiques chl a,

β -carotène)

- . absorption du β -carotène dans des longueurs d'onde allant de 400 à 500 nm, alors que
- . l'absorption de la chlorophylle a s'effectue encore entre

$$\left\{ \begin{array}{l} 400 \text{ et } 500 \text{ nm, puis} \\ 600 \text{ et } 700 \text{ nm} \end{array} \right.$$
- . Spectres d'absorption et de la fluorescence de la chl a non altérés
- . Temps de vie de la molécule de chl a à l'état excité (*S_1)
 $\approx 5 \times 10^{-9}$ sec. (temps de vie observé)
- Temps de vie du β -carotène à l'état excité: $< 10^{-9}$ sec.

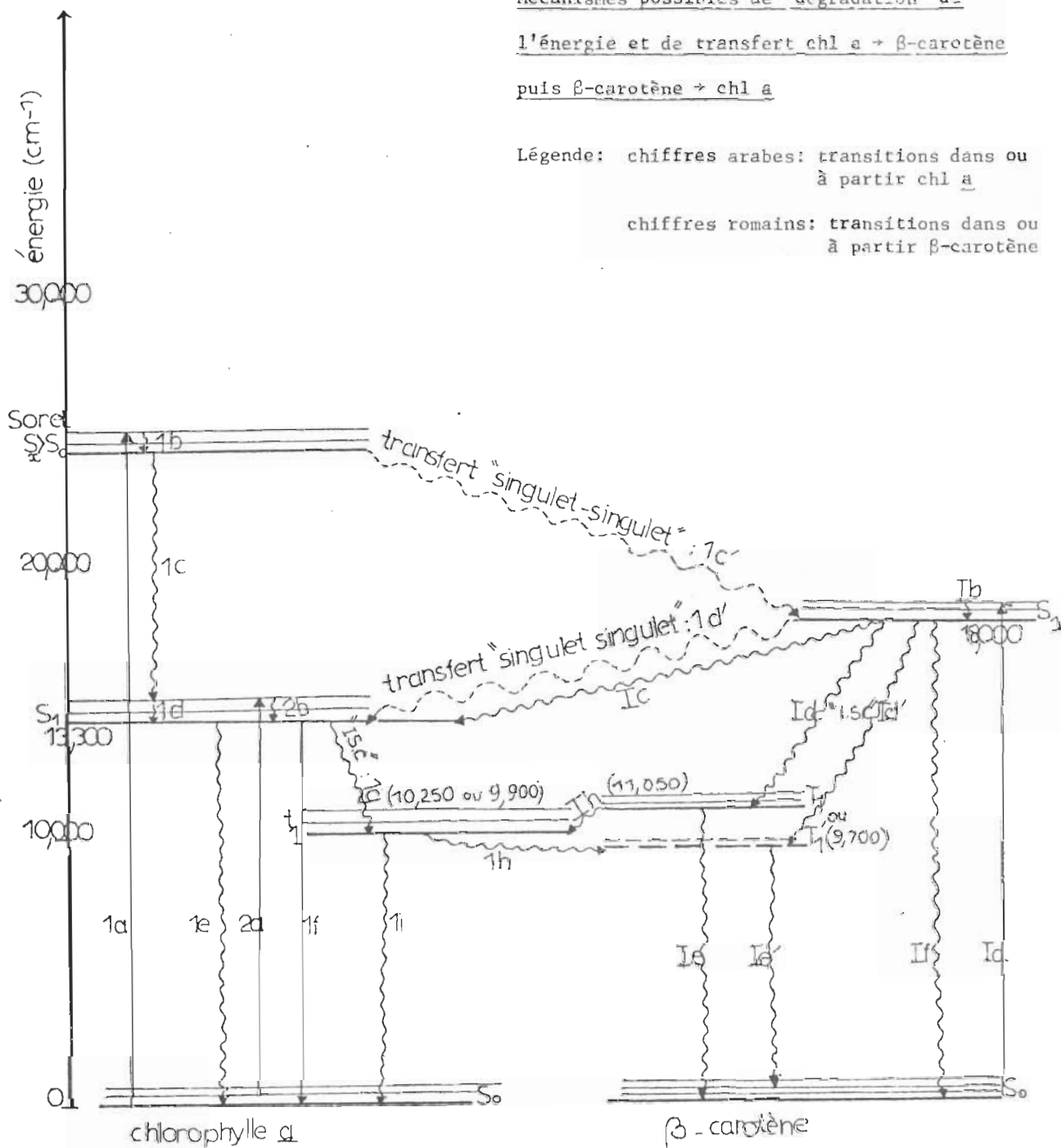
En résumé,

La nature des propriétés biophysiques du système considéré en font donc une entité qui possède toutes les conditions pour que des transferts d'énergie d'excitation du type faible puissent se produire.

schéma (4)

Mécanismes possibles de "dégradation" de
l'énergie et de transfert chl a \rightarrow β -carotène
puis β -carotène \rightarrow chl a

Légende: chiffres arabes: transitions dans ou
à partir chl a
chiffres romains: transitions dans ou
à partir β -carotène



Explication du Diagramme: schéma (4)

I. Absorption par la chlorophylle a

- dans le bleu: l_a

Utilisation de l'énergie:

conversion interne: l_b au niveau de l'état S_x

et l_c de S_x au niveau k plus bas, de S_1

transfert d'énergie chl a \rightarrow β -carotène: type singulet-singulet

(correspond au "quenching" de l'état singulet de la

chl a par β -carotène): l_c'

transfert d'énergie β -carotène \rightarrow chl a type singulet-singulet: l_d'

Restrictions relatives à ces 2 types de transfert: Ils doivent avoir

lieu pendant un temps $<$ temps de vie naturel de $S_x < 10^{-10}$ sec.

A partir de S_1 : 1f transition radiative $S_1 \rightarrow S_0 =$ fluorescence (faible)

1e transition non " $S_1 \rightarrow S_0 =$ conversion interne

1g transition interdite non radiative $= S_1 \rightarrow t_1$

combinaison inter-système: "I.S.C." ("inter-system crossing")

A partir de t_1 : 1j: transition non radiative $t_1 \rightarrow S_0$: conversion interne

(transition radiative: phosphorescence non prouvée

à date)

1h: transfert d'énergie chl a \rightarrow β -carotène

type triplet-triplet

à condition que le niveau triplet le plus bas du

β -carotène soit $<$ à celui triplet de la chl a

A ces différentes manifestations de la répartition de l'énergie absorbée dans le bleu s'ajoute les phénomènes suivants qui peuvent se produire dans le rouge, et dans le Bleu.

- dans le bleu) et dans le rouge:

Absorption de l'énergie lumineuse: 2a

Conversion interne $^1S_x \rightarrow ^0S_1$ 2b

Transition non radiative $S_1 \rightarrow S_0$ = conversion interne: 1e

Transition radiative $S_1 \rightarrow S_0$ = fluorescence : 1f

A partir de 0S_1 puis t_1 voir paragraphe précédent.

N.B. Quand l'absorption par le chl. a se fait dans la région des

Bandes Soret, la désexcitation qui se produit à partir de S_1 n'est pas une transition radiative, alors qu'elle l'est lorsque l'absorption à lieu dans le rouge (61).

Faudrait-il penser qu'un transfert d'énergie: singulet supérieur-singulet, de la chl. a vers le β -carotène, est très efficace et que le β -carotène joue dans ce cas le rôle d'un quencher obligatoire?

II. Absorption par le β -carotène et utilisation possible de l'énergie:

Absorption $S_0 \rightarrow ^mS_1$: 1a

Conversion interne dans S_1 : 1b

De 0S_1 : Transfert d'énergie singulet-singulet 1c

Transition interdite singulet-triplet I_d ou I_d'

suivant la valeur réelle (inter-system crossing : $I.S.C.$)

De T_1 : Transfert d'énergie triplet-triplet (β -carot \rightarrow chl a): I_h

Conversion interne : I_e

Transition radiative $T_1 \rightarrow S_0$ c'est-à-dire phosphorescence,

non mise en évidence.

ou bien,

De T_1' : Seule transition non radiative $I'e$

(Pas de phosphorescence du β -carotène.)

De 0S_1 : Transition non radiative I_f

(Pas de fluorescence du β -carotène)

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

III - MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

III.1 Pureté des produits et des solvants

Une attention extrême doit être apportée au choix des solutions utilisées pour la calibration des appareils, et celles qui doivent être analysées par la suite.

La description de la technique des monocouches (141 à 145) au paragraphe suivant, donnera une idée peu précise de toutes les causes d'erreurs qui peuvent être engendrées lorsqu'une impureté, la plus infime soit-elle, se trouve présente dans la solution!...

C'est dire que tout élément qui entrera en contact avec le dispositif instrumental, et le bain de Langmuir en particulier, doivent être rigoureusement propres et exempts de toute trace graisseuse et même de poussière atmosphérique. A cette fin l'éther de pétrole et le diéthyléther seront utilisés fréquemment comme agents de nettoyage.

De plus, l'eau utilisée pour calibrer le bain, toutes les solutions étudiées et les solvants doivent être les plus purs possibles (99% pur).

Origine et Nature des produits les plus fréquemment employés:

- Solvants: - Eau (voir paragraphe III.2.2)

- Diéthyléther, Analar, B.D.H. Dorval, P. Qué.

- N-Hexane, Fisher Scientific Company, 99% pur.
- Benzène, Fisher Scientific Company, 99% pur.
- Solutés:
 - Chlorophylle a, from Spinach, free of chlorophylle b
Sigma Chemical Company.
 - β -carotène, from carrot, free of α -carotene
Sigma Chemical Company.
 - Acide stéarique, Applied Sciences Laboratories Inc.
99+%.
 - Acide arachidique, Applied Sciences Laboratories Inc,
99+%.
 - Phytol: Sigma Chemical Company, 95%.
 - Cholesterol
Applied Sciences Laboratories Inc., 99+%.

III.2 Technique des monocouches

Afin de simuler l'état monomoléculaire des pigments dans le chloroplaste, nous avons élaboré une technique permettant d'obtenir des monocouches de mélange β -carotène - chlorophylle a à l'interface air-lipide.

L'appareil utilisé porte le nom de celui qui l'a conçu soit Langmuir (143).

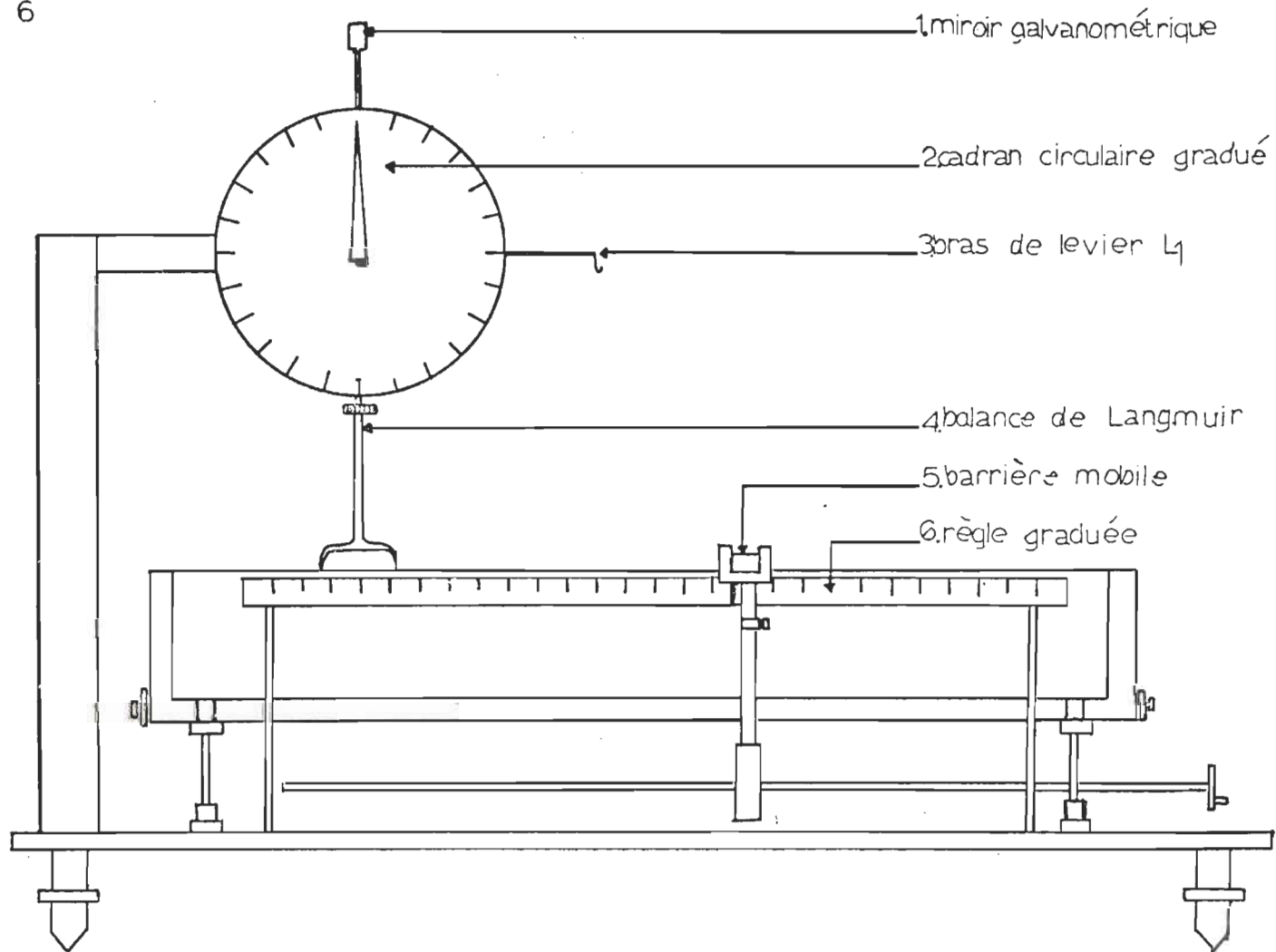
III.2.1 Description de l'appareil: Bain de Langmuir (schémas 6 et 7)

Il a été adapté pour nos expériences, et il comprend:

- une cuve de verre A

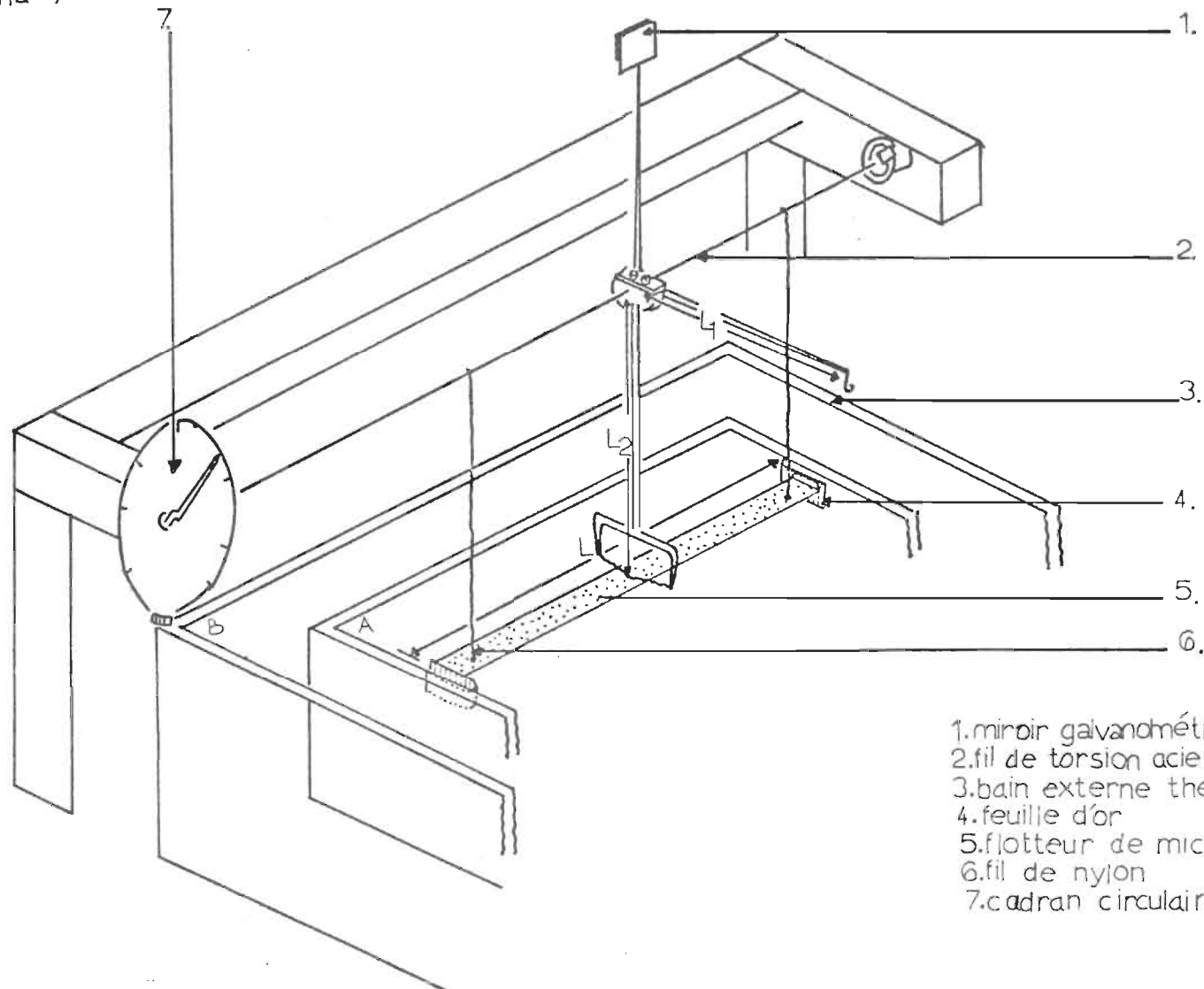
longueur: 35 cm

schéma 6



BAIN DE LANGMUIR

schéma 7



- 1. miroir galvanométrique
- 2. fil de torsion acier inoxydable
- 3. bain externe thermostaté B
- 4. feuille d'or
- 5. flotteur de mica
- 6. fil de nylon
- 7. cadran circulaire gradué

BAIN DE LANGMUIR

largeur: 14.9 cm

hauteur: 5.0 cm

Les parois sont encollées avec un produit insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques: Silicone seal (Canadian General Electric). Cette cuve repose à l'intérieur d'un deuxième bain B de dimensions plus grandes, où circule un réfrigérant.

longueur: 40.0 cm

largeur: 22.0 cm

hauteur: 7.0 cm

A dix centimètres d'une des extrémités du bain A,

- un flotteur de mica dont les éléments proviennent de:

Cenco Central Scientific Company,

longueur: 13.0 cm

largeur: 0.7 cm

hauteur: 0.0012 cm

Les différents éléments sont maintenus entre eux par une colle solide spéciale que l'on chauffe à l'aide d'une spatule faisant office de fer à souder:

"Cement-Fisher Pyseal"

Le flotteur est rattaché, d'une part, aux parois latérales du bain par

- deux minces feuilles d'or

longueur: 3.0 à 4.0 cm

largeur: 0.5 cm

épaisseur: 0.00024 cm

provenant de G. Wiley Ltd. (Ruislip Middlesex - England)

et d'autre part à,

- un fil d'acier inoxydable

longueur: 21.0 cm

épaisseur: 2.5×10^{-2} cm

origine: Fisher Scientific Company, Montréal, Qué.

très sensible, situé à 10 cm au dessus de la surface du bain, par l'intermédiaire d'une pièce d'aluminium très légère.

Cette pièce d'aluminium est percée d'un trou dans lequel passe le fil de torsion en acier, maintenu par une vis.

Elle se compose également de deux bras,

- l'un, muni d'un crochet, vers l'avant, indispensable pour la calibration de l'appareil
- l'autre portant un miroir.

Le flotteur de mica est aussi directement rattaché au fil d'acier inoxydable par deux fils de nylon, collés à l'aide d'une goutte de "Pyseal", ou de collodion, de chaque côté de la pièce d'aluminium.

On peut mesurer l'angle de torsion supporté par le fil d'acier, à l'aide d'un cadran circulaire gradué en degrés. Il est à noter que si l'une des extrémités du fil de torsion est reliée à ce cadran, l'autre par contre demeure fixe. L'ensemble formé constitue un système optique basé sur le principe d'un levier; en effet:

- une barrière mobile, en verre dépoli, couverte de Teflon aux deux extrémités,
(Teflon Tape, Type T, largeur: 2.54 cm
Commercial plastics and Supply, Montréal, Qué.)
peut être déplacée manuellement d'une extrémité à l'autre, du bain, le long d'une règle graduée. Elle glisse sur les parois latérales du bain, recouvertes de Teflon et sert à compresser une quantité connue de molécules déposées à la surface de la sous-phase. Sous l'effet de cette pression, le flotteur de mica transmet une certaine force provoquant une torsion du fil. Le phénomène est contrôlé par:
 - le cadran circulaire gradué en degré
 - l'inclinaison du miroir galvanométrique.

III.2.2 Principe de la technique des monocouches

- Nettoyage du Bain de Langmuir.

La cuve, le flotteur, la barrière mobile et leurs accessoires, que l'on peut isoler de la poussière par un couvercle, doivent être maintenus rigoureusement nets. Pour ce faire, des soins minutieux sont apportés lors de leur entretien. Après chaque expérience individuelle, les instruments et le bain sont nettoyés au diéthyléther ou à l'éther de pétrole et rincés plusieurs fois à l'eau bidistillée.

Une vérification des feuilles d'or et du flotteur est recommandée pour éviter les fuites qui pourraient

se produire par le moindre petit interstice.

(Lorsque le remplacement des feuilles d'or, qui sont extrêmement fragiles, s'avère nécessaire, beaucoup de délicatesse et de propreté sont de rigueur).

C'est par succion, grâce à une pipette Pasteur, reliée par un tube en caoutchouc à une pompe à eau, que se fait le vidage des cuves, ou le nettoyage de la surface des phases liquides contenues dans le bain.

Dans ce dernier cas, on procède de la manière suivante:

La pièce étant obscure, on irradie tangentielle-ment la surface de la phase sur laquelle seront déposées les molécules. Toutes les particules de poussière diffractant cette lumière, il devient aisé de les localiser et de les éliminer.

On commence d'abord dans la zone comprise entre le flotteur et l'extrémité opposée la plus proche. La barrière mobile qui a été ramenée à l'autre extrémité délimite une surface restreinte que l'on nettoie en second. On ramène alors rapidement la barrière à une dizaine de centimètre du flotteur tout en aspirant les impuretés. Un deuxième nettoyage de chaque côté de la barrière et au niveau du flotteur complètera le travail. Pour vérifier qu'il ne reste plus de

particules étrangères, on observe sur un écran le mouvement de l'index réfléchi par le miroir galvanométrique. Aucune variation dans un sens ou dans l'autre ne doit exister.

N.B.: Autre condition nécessaire: La cuve interne doit être remplie de solution au maximum, de manière à ce que la barrière mobile adhère parfaitement à la surface. On aura facilité ceci en succionnant la sous-phase de chaque côté de la barrière mobile.

Ce n'est qu'une fois cette manipulation complétée que la déposition des pigments est entreprise.

Déposition des pigments

Toujours dans l'obscurité, on dépose à l'aide d'une micro-seringue, une quantité connue de pigments. La barrière a été éloignée à vingt (20) centimètres approximativement du flotteur. Pour éviter que les molécules en solution dans le diéthyléther ne tombent dans la phase tampon plutôt qu'à la surface, la seringue est placée à deux ou trois centimètres au dessus du bain. Après chaque goutte de solution, on laisse le temps aux molécules de se répartir d'une manière uniforme sur la surface prévue. L'index réfléchi par le miroir galvanométrique permet de suivre le mécanisme. Dans un premier temps, l'addition de molécules à la surface de la solution tampon, oblige le flotteur

à "reculer", puis après quelques secondes, les molécules occupent librement l'espace disponible, amenant le flotteur à retrouver sa position d'équilibre. La pièce en aluminium reliée au flotteur et qui porte le miroir, transmet donc tous les déplacements subis par le flotteur.

De la même façon, des fuites de molécules, au niveau de la barrière mobile, des feuilles d'or, du flotteur de mica, ou par "dissolution" (précipitation) dans la phase tampon peuvent être décelées. Une fois toutes les molécules déposées, on les compresse en ramenant la barrière mobile à une distance déterminée du flotteur. Cette distance dépend du nombre et de la nature des molécules. Elle délimite une surface telle que les molécules qui l'occupent se trouvent être juxtaposées, sans qu'il y ait chevauchement des unes sur les autres. Dans de telles conditions, cette monocouche de pigments a produit une torsion du fil d'acier inoxydable dont l'angle est mesuré à l'aide du cadran gradué. Lorsque cette distance critique est réduite, le phénomène du "collapse", dont nous parlerons plus loin, est amorcé et devient "incontrôlable".

Déposition des monocouches de pigments sur les lamelles de quartz

A une pression de surface connue, contrôlée par l'angle de rotation du fil de torsion, et maintenue constante par le

déplacement progressif et régulier de la barrière mobile, on immerge lentement une lamelle de quartz. C'est elle qui sera recouverte des molécules de pigments. La descente et la remontée de la lamelle sont effectuées par un moteur rotatif de façon à ce que le mouvement soit le plus homogène possible, à une vitesse de un tour toutes les trois minutes. Un axe muni d'une pince maintient la lamelle et la soumet aux mouvements verticaux du moteur. La fixation des molécules sur la surface de quartz (ou de verre) dépend de la nature hydrophile ou hydrophobe de la lamelle et de l'orientation des groupements polaires des molécules à la surface du bain de Langmuir.

- Dimensions et Caractéristiques des lamelles

quartz	verre	
5.10	5.0	longueur (cm)
2.50	2.40	largeur (cm)
0.10	0.15	épaisseur (cm)

provenance:

lamelle de quartz:

.Esco Products

New Jersey, New Jersey,
U.S.A.

lamelle de verre:

. Otta, Watska, Cie Ltee,
Montréal, P. Qué.

- Exemple concret illustrant le mécanisme:

chlorophylle a à l'interface air/lipide.

a) Généralement, on a l'habitude de déposer les molécules de chlorophylle a sur une base lipidique. Ce lipide a pour propriété, outre celle d'être un sel d'acide gras présent

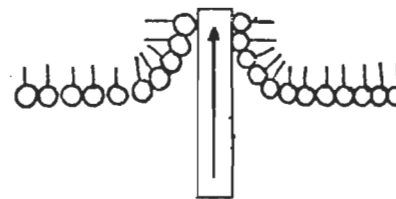
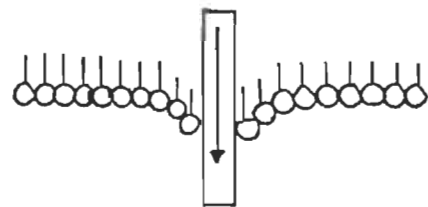
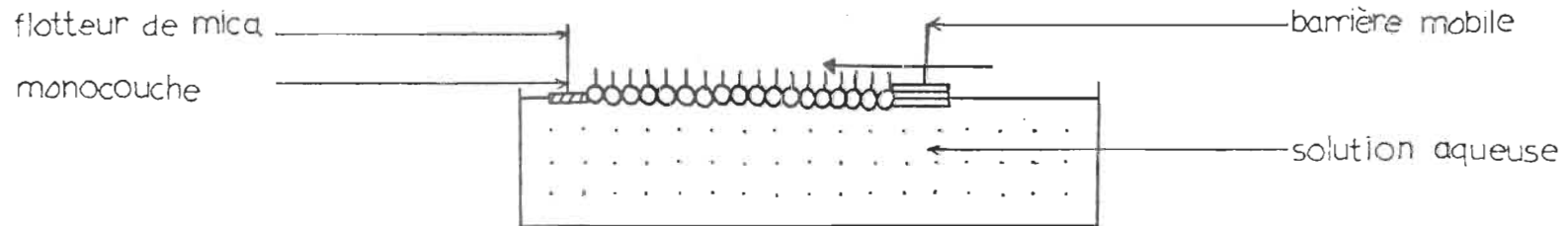
dans la cellule vivante, de rendre plane et uniforme la surface de la lamelle de quartz, qui à l'échelle moléculaire présente de grosses imperfections.

A l'aide d'une microseringue, on dépose donc une quantité connue d'acide arachidique (1×10^{-3} M dans diéthyléther) à la surface de la phase aqueuse (HCl: 1×10^{-2} M, CdCl_2 : 1×10^{-4} M) qui remplit le bain.

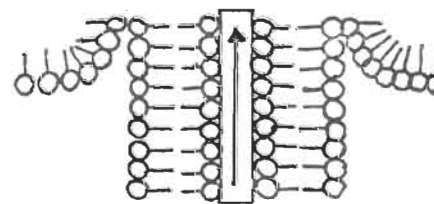
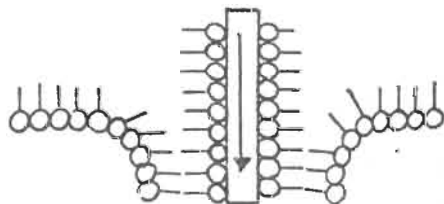
Les molécules sont ensuite comprimées jusqu'à une pression de surface de $30 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$, pression limite à laquelle on immerge la lamelle de quartz. La lamelle de quartz, nue, est hydrophile, elle retiendra le lipide lors de la remontée seulement, quand elle rencontrera les groupements polaires de ces molécules. A sa première sortie du bain, la lamelle de quartz sera recouverte d'une seule couche d'arachidate de cadmium et ce sur chacune des deux faces. Chaque face est à présent hydrophobe. A la deuxième plongée, lors de la descente, les groupements hydrophobes libres des molécules de lipides, à la surface de la lamelle, fixeront les groupements hydrophobes des autres molécules dressées à la surface de la solution tampon. Par contre lors de la remontée, ce seront les groupements polaires des molécules fixées à la lamelle, qui s'associeront avec la tête polaire des sels d'acide gras situées à l'interface. Ainsi à sa deuxième sortie du bain, la lamelle de quartz portera trois monocouches de lipide sur chacune

schéma 8

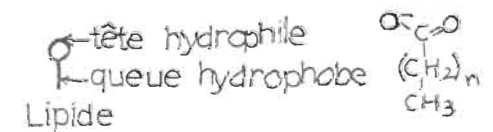
TECHNIQUE des MONOCOUCHEs



PREMIERE PLONGEE



DEUXIEME PLONGEE



des faces (schéma 8). Elle est prête à recevoir les monocouches de chlorophylle a subséquentes.

b) L'eau tamponnée du bain, ayant été remplacée par une solution dibasique (pH: 8.0), on reprend la même technique que celle qui vient d'être décrite mais en substituant la chlorophylle a à l'acide arachidique. Il est à remarquer que, dans ce cas, la pression de surface à maintenir constante est de vingt deux dynes $\times \text{cm}^{-1}$, ce qui implique une aire moléculaire de 90 \AA^2 aux pigments photosynthétiques. De plus, dès la première plongée, la surface de la lamelle étant hydrophobe, elle fixera la partie non polaire des molécules de chlorophylle a.

Conservation des lamelles

Les lamelles qui portent des monocouches de pigments sont placées dans un dessiccateur noir, et mises à l'obscurité afin d'éviter toute décomposition ou décoloration des produits par l'air ou la lumière. Elles seront étudiées immédiatement.

Les lamelles qui portent des monocouches de lipides seront également conservées dans ce récipient. Elles seront utilisées dans les deux jours qui suivent leur préparation.

Le nettoyage des lamelles de quartz est un travail minutieux: il faut les immerger pendant plusieurs (deux) heures

dans l'acide chromique ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$) chaud et concentré puis les rincer abondamment à l'eau. On les place ensuite jusqu'à utilisation dans l'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 N. A ce moment-là, on les lave soigneusement à l'eau distillée, on les sèche, et on évite toute contamination subséquente. Un tel entretien des lamelles nous permet de les utiliser de six à huit mois. Par contre cette période est énormément réduite en ce qui concerne les lamelles de verre qui sont rapidement attaquées par l'acide.

III.2.3 Critères de pureté de l'eau

La calibration du bain de Langmuir s'effectue en utilisant de l'eau la plus pure possible. Généralement, plusieurs distillations (trois) sont nécessaires pour fournir une eau débarrassée d'ions, de sels minéraux, et de substances organiques diverses, qui n'engendrera pas d'erreur appréciable dans nos mesures.

Pour ce faire, le montage à distillation que nous utilisons au laboratoire comprend un système en série où aucune manipulation n'est prévue avant le prélèvement final (145). Du permanganate de potassium saturé et de l'hydroxyde de sodium 1.0 N, servent de déminéralisant et d'oxydant de matières organiques. La neutralisation des amines présentes est prévue par l'addition d'acide sulfurique concentré.

Avant chaque expérience, des mesures de conductivité et de tension de surface sont prises pour vérification des critères de pureté de l'eau. Les appareils utilisés sont un tensiomètre de surface: Surface Tensiometer Fisher et un Metrohm Herisau pour la conductivité, chacun ayant été calibré à l'aide de solutions précises et de grande pureté (n-hexane, benzène et $\text{KCl}:1 \times 10^{-2} \text{ M}$ respectivement).

Un tableau (tableau 3) donnera une idée de la fluctuation des caractéristiques de quelques échantillons d'eau suivant leur nature et le nombre de distillations auxquels ils ont été soumis. Dans la majorité des expériences réalisées au long de ce présent travail, une attention sérieuse a été apportée quant à l'utilisation de l'eau que nous nous efforçons de choisir la plus pure possible.

La figure 5 est un exemple de résultat obtenu à partir d'une eau dont les critères de pureté n'étaient pas satisfaisants (même après bidistillation). Nous pouvons voir clairement à quel point les facteurs deviennent prépondérants lors de la préparation de la solution aqueuse à l'interface de laquelle nous déposons nos molécules de pigments. Evidemment, il devient inutile de préciser que les chances de dépositions

Tableau 3: Evaluation des Critères de Pureté de l'eau disponible

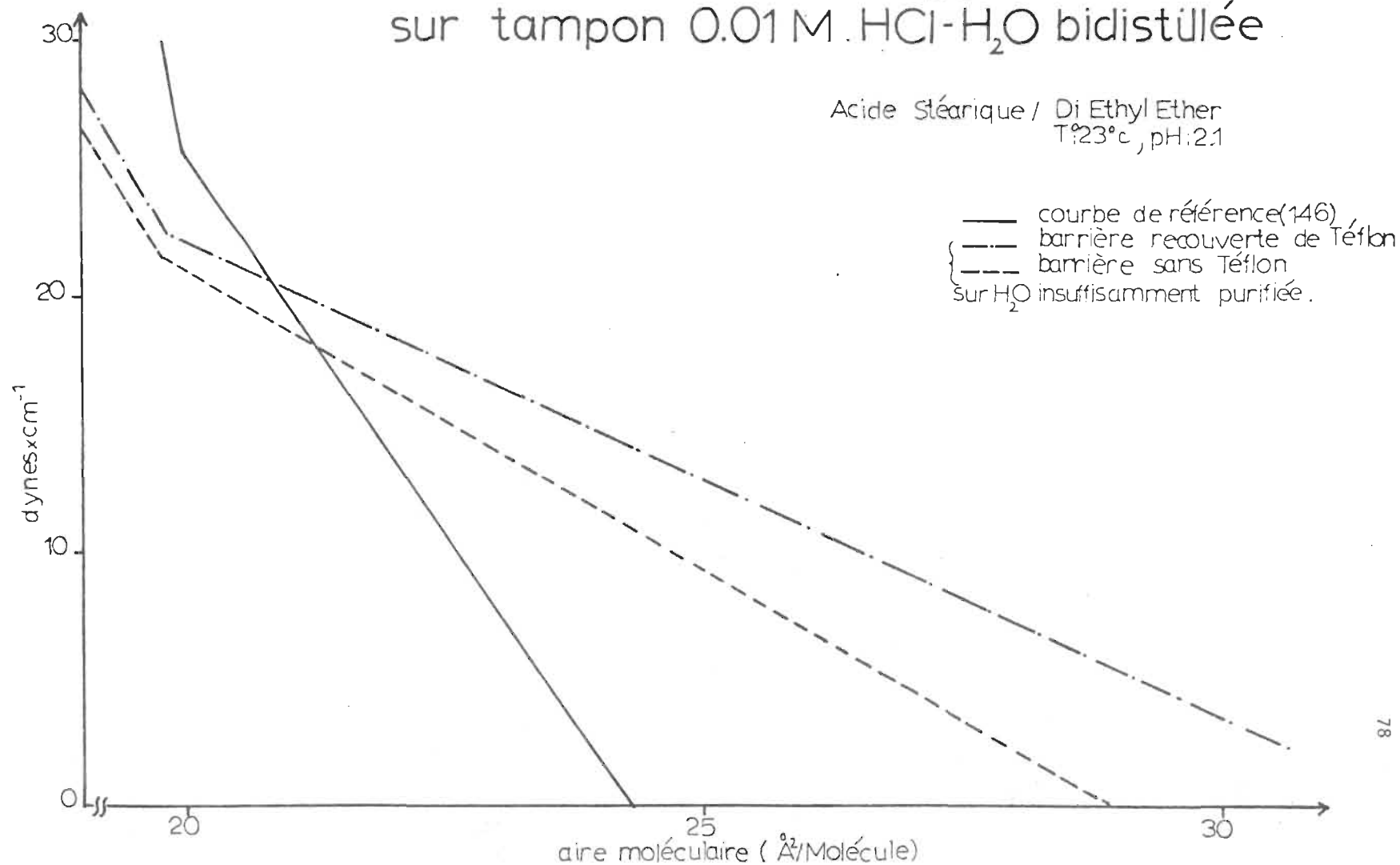
Type d'échantillon	Tension de Surface (dynes x cm ⁻¹)	Conductivité (MΩ ⁻¹)
H ₂ O pure (référence)	72	> 1.5
H ₂ O non distillée a) en laboratoire b)	58.20 58.72	201.3 8.9
H ₂ O monodistillée a) b)	59.46 60.00	8.32 1.65
H ₂ O bidistillée a) b)	60.47 60.6	7.60 1.52
H ₂ O tridistillée a) après 1 semaine de b) mise en marche c)	60.72 60.90 62.3	5.36 3.37 2.09
. 2 semaines c)	65.8	1.13
. 3 semaines c)	66.45	1.07

- a) eau provenant de la Compagnie "Pepsi - Seven Up"
Cap-de-la-Madeleine, P. Qué.
- b) eau préalablement filtrée et distillée dans un système
"Corning-Déminéraliseur".
(Haute Capacité) Corning glass works. New York, U.S.A.
- c) eau déjà distillée dans un système "Barnstead".
Fisher, Fisher Scientific Co., Sherbrooke, P. Qué.

fig.5

CRITERES DE PURETE DE L'EAU

Courbe de Pression de Surface
de l'Acide Stéarique $1.86 \times 10^{-3} \text{ M}$
sur tampon $0.01 \text{ M. HCl-H}_2\text{O}$ bidistillée



homogènes de la chlorophylle et du caroténoïde sur les lamelles de quartz en sont directement diminuées.

III.2.4 Calibrage du Bain

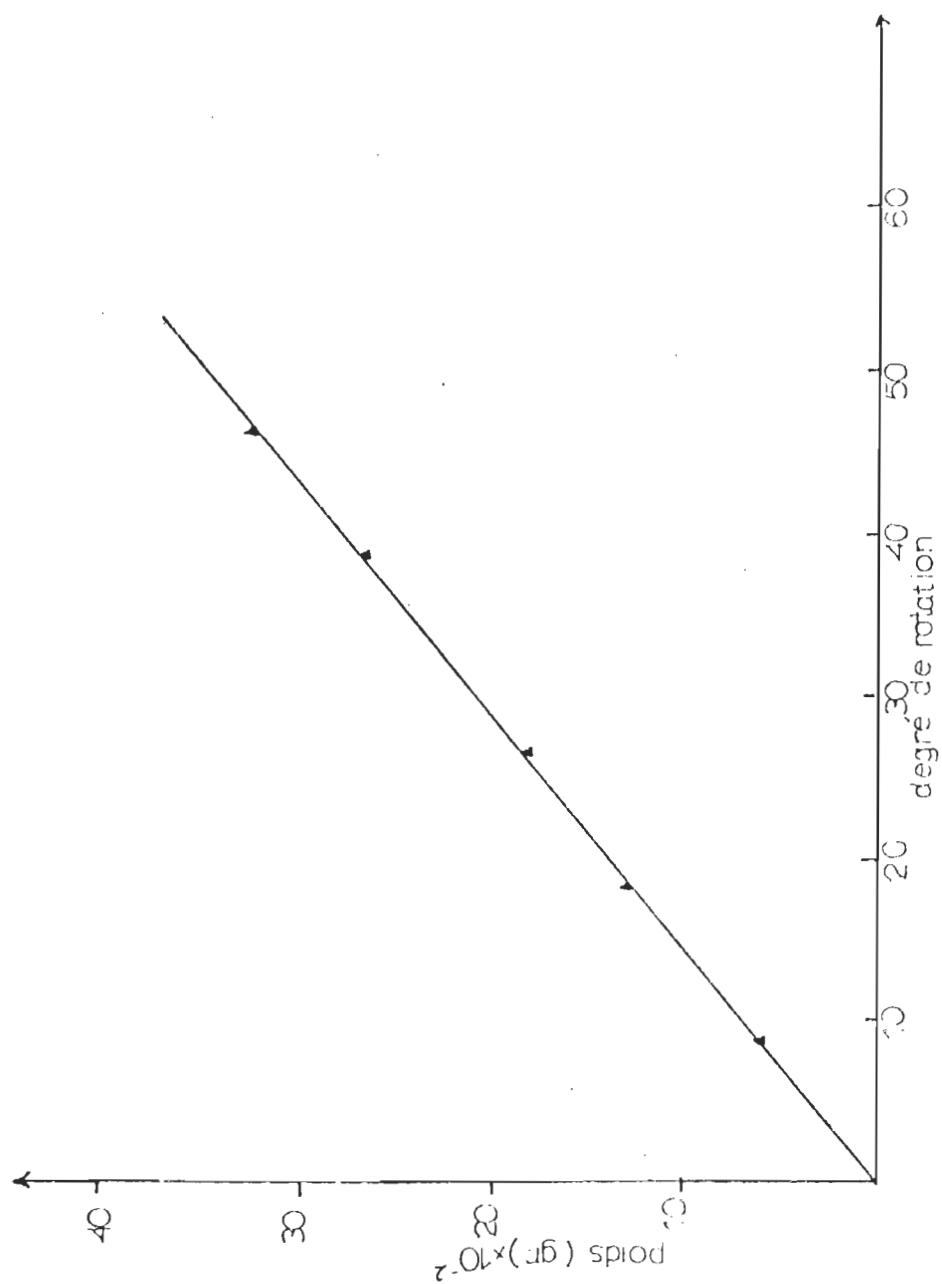
Après avoir nettoyé très soigneusement le bain et les pièces accessoires avec du diéthyléther pour dissoudre toute trace de graisse, la cuve est remplie entièrement d'eau distillée. Toute particule contaminante ou de poussière à la surface de l'eau est enlevée par succion. La barrière mobile est ensuite amenée à 1.5 cm du flotteur de mica, distance identique entre flotteur et paroi du bain. L'index du cadran circulaire, relié au fil d'acier inoxydable est ajusté au zéro, de même que l'index lumineux reflété par le miroir sur le tableau. On dépose ensuite par importance croissante, différents poids sur le plateau de la balance et l'on note l'angle de torsion imposé au fil d'acier correspondant.

Des mesures identiques sont prises lorsque les poids sont enlevés. Cette procédure nous permet d'établir le graphique donnant le poids (en grammes), en fonction de l'angle de torsion à partir duquel nous pourrions déduire la sensibilité de l'appareil (Tableau 4, figure 6).

Tableau no. 4

Calibrage du Bain de Langmuir

Poids (gramme)	Degré de Rotation: A		Degré de Rotation: B	
	aller	retour	aller	retour
0	0	0.5	0	0.4
0.0507	8.5	8.9	8.5	8.8
0.1651	26.0	26.3	26.1	26.3
0.2447	38.5	39.0	38.6	39.0
0.2925	46.0	46	46.1	46.1



CALIBRAGE de la P₃ALANCE de

LANGMUIR

fig 6

$$\text{Sensibilité} = S \text{ (dynes} \times \text{cm}^{-1} \times \text{degré}^{-1}) = \frac{w \cdot g \cdot l_1}{l_2 \cdot L \cdot \theta}$$

où S = sensibilité

w = poids déposé en grammes

g = accélération spécifique de la gravité

l_1 = longueur du bras de levier au bout duquel est suspendu le poids.

l_2 = longueur du bras de levier correspondant à la distance fil de torsion - flotteur de mica

L = longueur efficace du flotteur, en centimètre:

longueur réelle + $\frac{1}{2}$ distance totale: flotteur mica-paroi latérale du bain

θ = degré de rotation pour retourner à la position 0 (schéma 6, figure 6).

Résultats:

Pente de la droite fig. 5: 6.18 mg/degré

$$6.18 \times 10^{-3} \text{ g/degré}$$

$$S = \frac{6.18 \times 10^{-3} \times 980 \times 7.7}{8.8 \times 14.02} =$$

$$S = 0.38 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1} \times \text{deg}^{-1}$$

Courbes de pression de surface

Afin de vérifier les propriétés du bain de Langmuir, la pureté des produits, et déceler des fuites éventuelles, des

courbes préalables de pression de surface sont construites (figures 7,8). Les substances étudiées sont choisies en fonction de leur composition chimique et/ou de leur rôle présumé dans le transfert d'énergie du système biologique photosynthétique. C'est le cas des acides arachidique et stéarique entrant dans la composition des membranes du chloroplaste. La concentration généralement utilisée est de l'ordre de 1×10^{-4} à 1×10^{-5} M, et les solutions sont préparées avec un solvant qui s'évapore facilement, le diéthyléther. Comme précédemment décrit, on dépose à l'aide d'une microseringue 0.1 cc (ou un volume connu) de molécules à l'interface rigoureusement propre air - eau. On avance alors la barrière mobile qui va compresser les molécules contre le flotteur de mica. Au fur et à mesure de la compression, on note l'angle de torsion du fil d'acier inoxydable. A une pression de surface critique pour le soluté déterminé, l'angle de torsion ne varie plus: c'est le "collapse". Ceci indique que les molécules préalablement en monocouches, ne pouvant plus être compressées à cause de leur encombrement stérique, commencent à se chevaucher pour donner des couches de plusieurs molécules d'épaisseur.

Cette région du collapse est importante à relever car elle ne doit pas être dépassée lors de la déposition de monocouches sur des lamelles.

A titre de référence, quelques valeurs de la pression de surface, du collapse sont données dans le tableau 5 pour diffé-

COURBE de PRESSION de SURFACE
de l'Acide Arachidique / Benzène
sur H.Cl : 0.01 M (H₂O tridistillée)

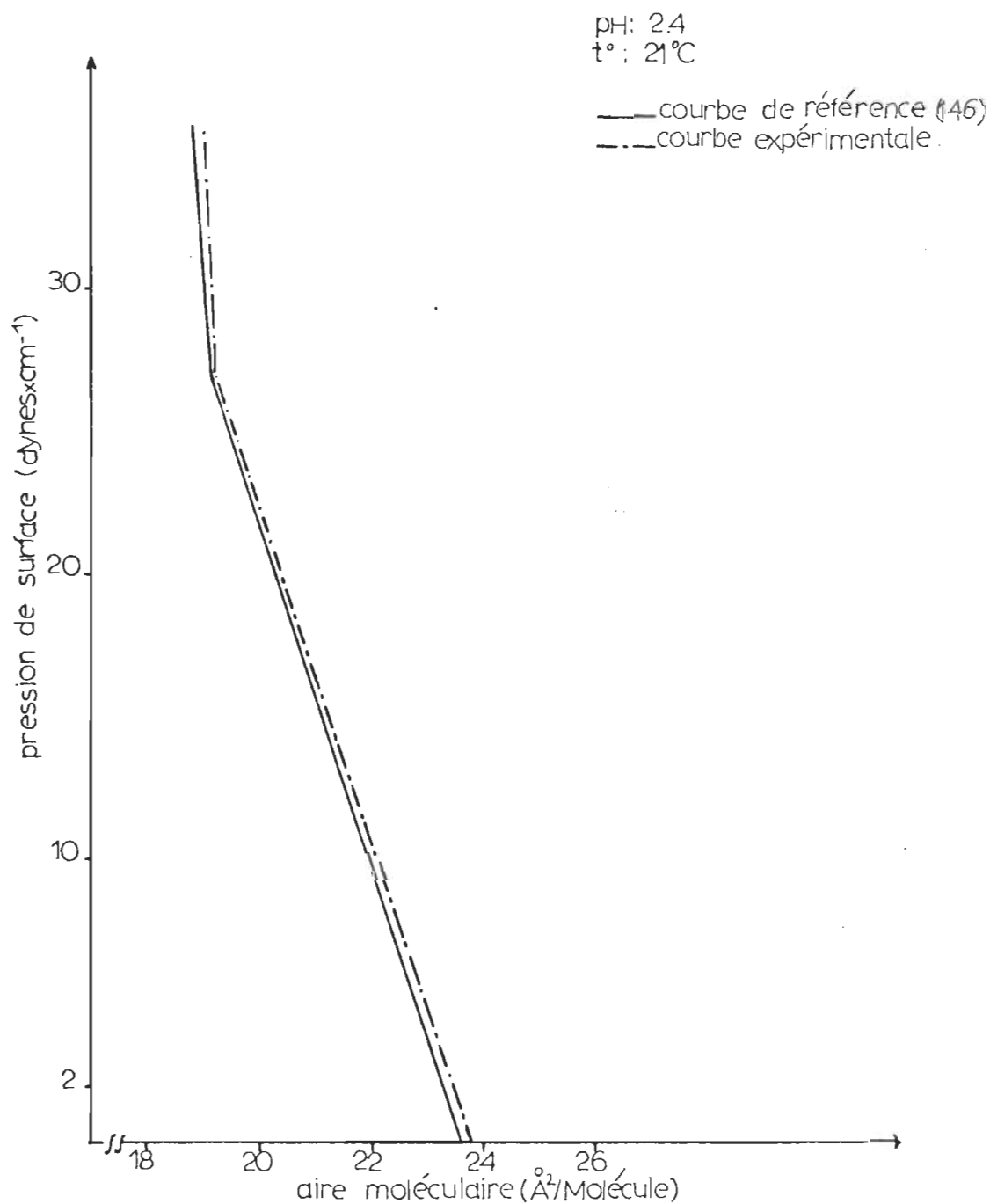


fig.8

COURBE de PRESSION de SURFACE de la CHLOROPHYLLE a /Di-Ethyl-Ether sur tampon phosphate $10^{-3}M$

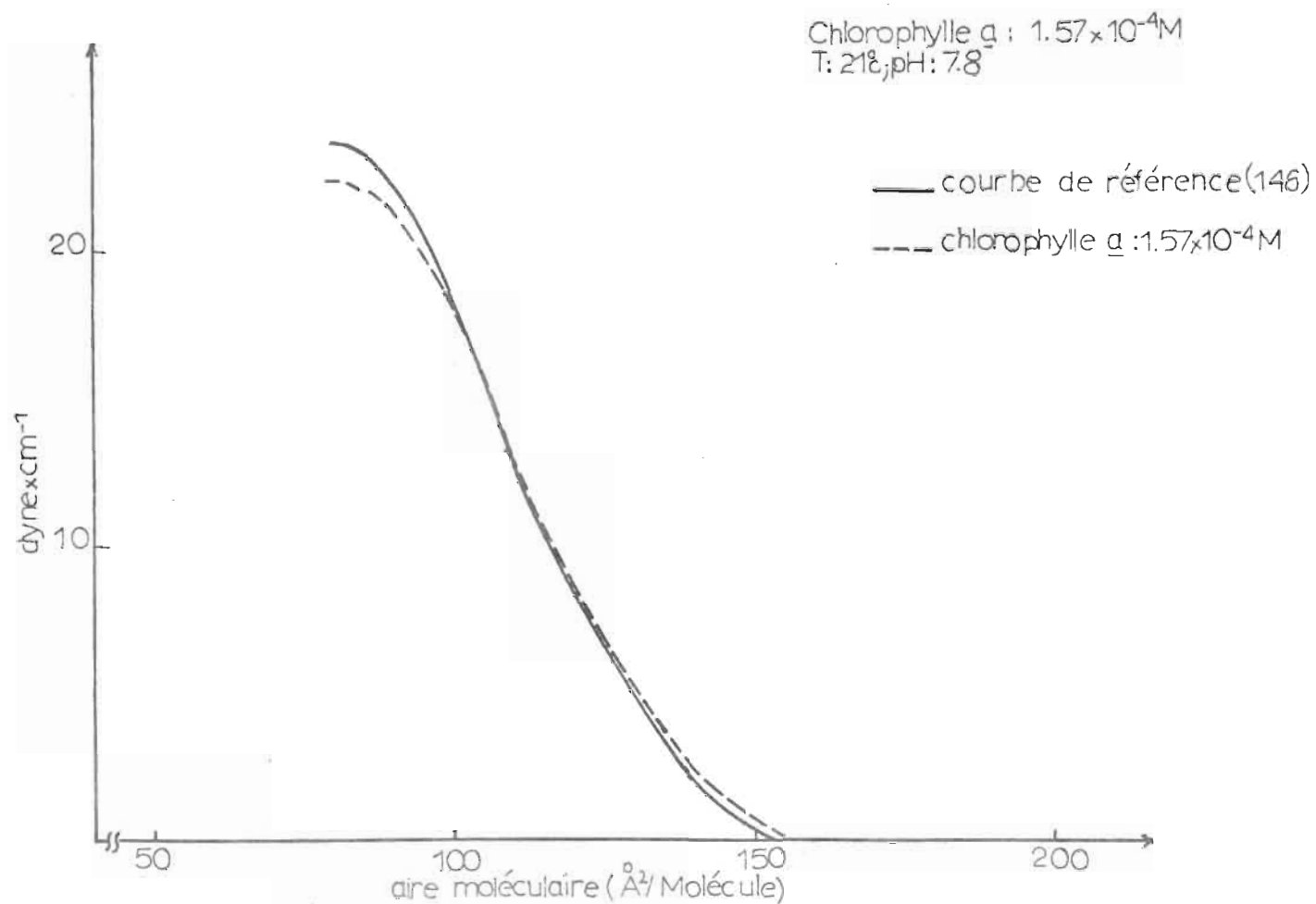


Tableau 5: Localisation du collapse pour différentes substances.

Substance	Solvant	Sous-phase	Pression au Collapse (dynes x cm ⁻¹)	Aire moléculaire (Å ²)
Acide Stéarique	n-Hexane	HCl: 0.01N pH: 2.0	26	20 Å ²
Cholestérol	Diéthyléther	H ₂ O bidistillée non tamponnée	30	38
Phytol	Diéthyléther	H ₂ O bidistillée dibasique; pH: 8.0	30	30
Chlorophylle <u>a</u>	Diéthyléther	H ₂ O bidistillée dibasique; pH: 8.0	22	30
Chlorophylle <u>b</u>	Diéthyléther	H ₂ O bidistillée dibasique; pH: 8.0	28	60

-rents pigments (146).

Lorsque le bain de Langmuir présente des fuites, afin de localiser l'endroit exact où les molécules quittent la surface compressée, on répand délicatement un peu de stéarate ferrique sous forme de poudre très fine et colorée, à l'interface air-eau. En avançant la barrière mobile, il est facile de suivre le déplacement de cette poudre qui va avoir tendance à s'échapper par les interstices.

Quand l'appareillage ne présente aucun défaut, les molécules de chlorophylle et de β -carotène sont déposées sur les lamelles de quartz déjà couverte d'une "base" dont le rôle essentiel est de rendre plane, au niveau "moléculaire", la surface de cette lame.

Cette base peut s'appeler: acide arachidique, stéarique, stéarate ferrique, etc... (Dans ce dernier cas, c'est seulement par simple essuyage de ce composé à l'aide d'un papier mouchoir qu'on réalise le but cherché).

Plusieurs moyens permettent d'estimer si une déposition terminée peut être considérée comme valable.

- Le plus simple consiste à souffler sur la surface de la lamelle une fois la déposition terminée et à observer à l'obscurité la partie embuée correspondant à la zone couverte de pigments. Si la surface ainsi délimitée est régulière et très homogène, les étapes suivantes sont

effectuées successivement:

* Evaluer le rapport de déposition:

$$\frac{\text{Surface du bain compressée}}{\text{Surface de la lamelle immergée dans la phase aqueuse}}$$

Un quotient égal à 1 indique une bonne technique de déposition.

* L'étude des spectres d'absorption et de fluorescence des pigments en monocouches doit fournir des résultats comparables à ceux de la littérature:

Tableau 6:

Absorption des monocouches de chlorophylle a sur Arachidate de Ba. (146)

	D.O. = densité optique par monocouche	Demi largeur de bande
- à 679 mμ (maximum dans le rouge)	0.008 - 0.009	42 - 45 Å
- à 438 mμ (maximum dans le bleu)	0.011 - 0.013	

$$*D = \frac{\text{Densité optique dans le Bleu}}{\text{Densité optique dans le Rouge}} \approx 0.5 - 0.6$$

. Ci-dessous sont énumérées quelques unes des principales causes de variation sinon d'échec lors de la préparation de monocouches:

- propreté rigoureuse de l'appareil et des accessoires (lamelles, spatules, etc...)
- pureté des produits et des solvants
- renouvellement des phases aqueuses
- température de l'expérience
- pH de solutions tampons, et leur composition
- vitesse de compression des molécules
- vitesse d'immersion des lamelles
- nature hydrophile ou hydrophobe de la lamelle sur laquelle les pigments seront déposés
- région du collapse non établie clairement
- fuites éventuelles de molécules, etc...

III.3 Spectrophotométrie d'absorption

L'étude des propriétés photophysiques des molécules de pigments, soit en solution, soit en monocouches va nous amener à utiliser les deux types d'appareils: spectrophotomètre d'Absorption "Unicam SP 1800" spectrofluorimètres - "Perkin Elmer"
- lasers

1- Description du spectromètre d'Absorption

"Unicam SP 1800 Spectrophotometer"

Pye Unicam Ltd. Cambridge, England.

Il s'agit d'un spectrophotomètre d'absorption à ultraviolet, et à double faisceau. Quelques unes de ses caractéristiques sont les suivantes:

- . Source de tension : Tension: 110 - 120 / 200 - 250 volts
Fréquence: 50 ou 60 Hertz
- . Sources lumineuses: Arc au deuterium
Lampe à filament de tungstène.
- . Balayage : Manuel ou automatique
possible entre 190 et 850 nm.
- . Fentes : largeurs variables entre 0.01 mm et 1.0 mm
Fente couramment utilisée: 0.25 mm
correspondant à une Largeur de bande
de: 0.8 nm
- . Monochromateur : Type "F/10 Ebert grating"
distance focale: 25.4 cm
limite de résolution pour les fentes
les plus minces: 0.1 nm
- . Photomultiplicateur: Type EMI 9558 QB
échelles d'Absorbance: 0-2; 0-1; 0-0.5;
0-0.2

Précision photométrique: $\pm 1\%$ à n'importe quelle échelle utilisée

Précision sur la longueur d'onde: ± 0.5 nm

Lumière diffusée: $<1\%$ à 200 nm

. Enregistreur "Unicam AR 25"

2 échelles de vitesse du papier: sec./cm

min./cm

. Cellules utilisées: quartz Hellma (Toronto, Ont.)

2- Utilisation

L'appareil a été utilisé pour déterminer les spectres d'absorption de solutions (10^{-8} à 10^{-4} M) et de monocouches de chlorophylle a, et de mélange "chl a/β-carotène".

III.4 Spectrofluorimétrie

1- Spectrofluorimètre "Perkin-Elmer" M.P.F.-2A

Cet appareil qui porte le nom de:

"Fluorescence spectrophotometer Perkin Elmer MPF-2A" (Norwalk-Connecticut, U.S.A.) permet d'obtenir des spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence de divers échantillons. (schéma 9).

La brève description suivante donnera une idée de son utilisation. Il est composé d'un

- spectrophotomètre avec - deux monochromateurs:

d'excitation et d'émission,

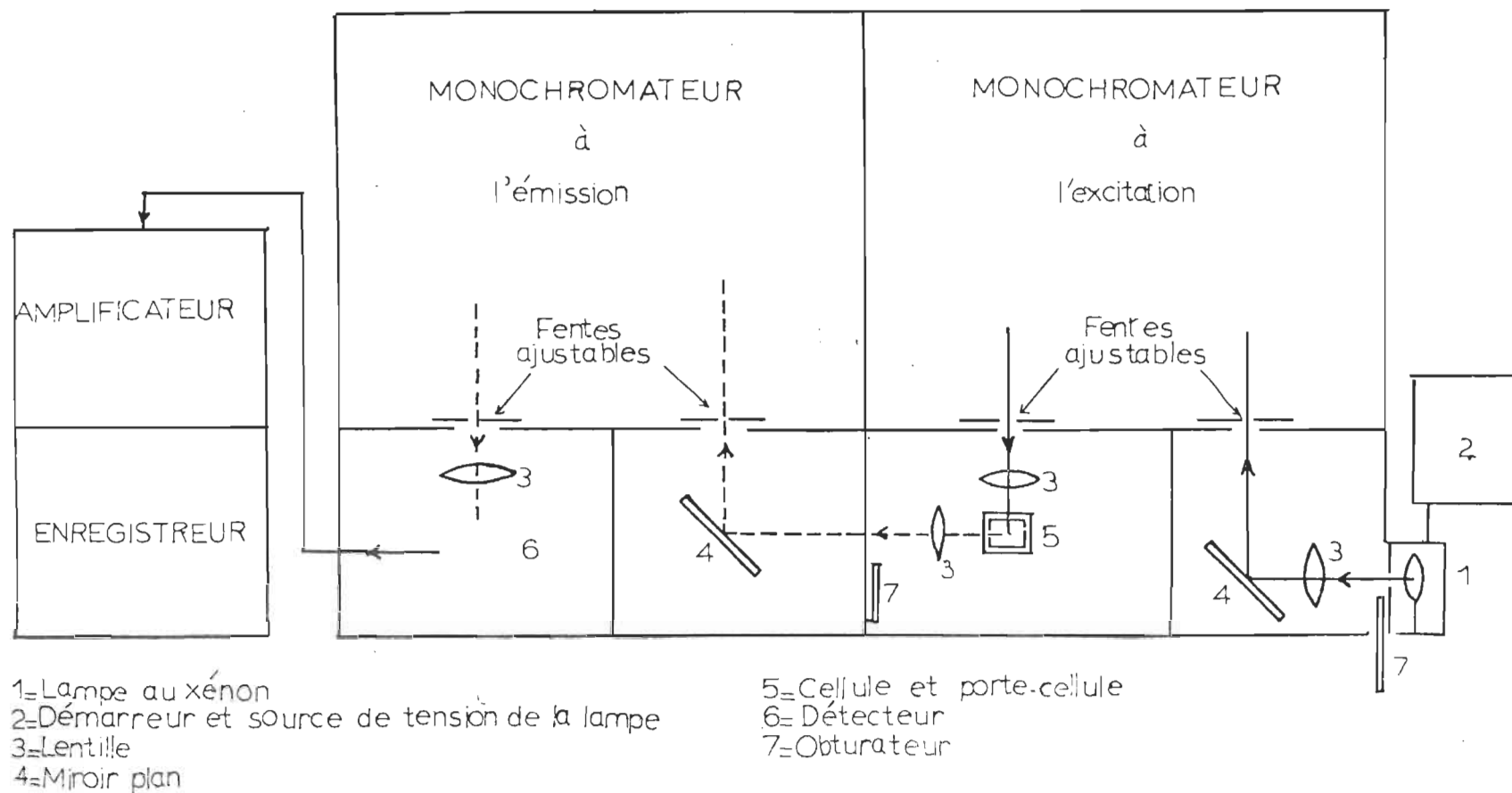
. l'un servant à irradier la substance avec de la lumière monochromatique entre 200 et 700 nm

. l'autre, qui détermine l'intensité de la lumière émise entre 220 et 800 nm

- deux photomultiplicateurs.

- source continue de lumière fournie par une lampe au Xenon de 150 watts, alimentée par une tension de 150 volts

schéma:9



SPECTROFLUORIMETRE MPF-2A
(schéma simplifié)

fréquence: 50 à 60 Hertz.

- monochromateur à fentes ajustables, variant de 0.13 à 5.16 mm, ce qui donne des largeurs de bandes allant de 1.0 à 40 mμ.
- amplificateur avec 6 positions différentes pour la sensibilité.

N.B.: Etant donné que les facteurs d'amplification respectifs n'étaient fournis qu'approximativement, un calibrage précis a été fait en se servant d'une solution de chlorophylle a.

Il a été ainsi trouvé que lorsqu'on passait de la sensibilité 3 à la sensibilité 4. le facteur était 2.87 au lieu de 3.
de la sensibilité 4 à la sensibilité 5. le facteur était 3.16 au lieu de 3.
de la sensibilité 5 à la sensibilité 6. le facteur était 2.98 au lieu de 3.

- enregistreur Modèle QPD-33, Perkin-Elmer, à deux vitesses de papier (50 mm/min.; 100 mm/min.).

Cet appareil d'une grande utilité pour nous, malgré ses nombreuses qualités, présente un inconvénient majeur: il n'est pas suffisamment sensible pour détecter de faibles

intensités de fluorescence provenant de solutions de concentrations inférieures à 10^{-8} M. L'une des causes principales est due à la nature même du spectrophotomètre: l'intensité de la lumière transmise par le monochromateur varie dans le même sens que la deuxième puissance de la largeur des fentes. Or, un spectre de fluorescence est d'autant plus précis que la lumière excitatrice est monochromatique et intense, donc lorsque la largeur de la bande à l'excitation est faible. Nous voilà donc rendus à une impasse lorsque notre étude porte sur un échantillonnage de solutions dont les concentrations varient de 10^{-12} M à 10^{-4} M !!

Pour résoudre ce problème, nous avons mis au point un système portant le nom de "spectrofluorimètre laser".

2- Spectrofluorimétrie - laser

a) Généralités:

Depuis leur découverte les lasers présentent des intérêts variés et de plus en plus importants dans un grand nombre de domaines (147) et une bibliographie sérieuse y est annexée (148-149). Leurs propriétés, telles que: cohérence, monochromaticité, puissance, polarisation, les rendent utilisables dans l'étude de l'interaction "Rayonnement - Matière" en Physique, Technologie, puis plus tard Chimie et Bio-Chimie (150 à 153). Il serait ambitieux de vouloir

résumer en quelques mots leur diversité mais notons néanmoins l'existence de

- lasers au Rubis et au Néodyme, caractérisés par une puissance élevée, dont l'énergie d'un pulse atteint plusieurs joules, en un temps aussi bref que 10^{-13} seconde .
- **lasers** aux gaz: Hydrogène, Deutérium, Bioxyde de carbone, d'une puissance de 10^5 watts, et d'une durée d'impulsion de l'ordre de la nanoseconde.
- Hélium/Cadmium, Hélium/Néon avec des puissances plus faibles mais fournissant une illumination continue. (153)
- lasers à colorants qui ont la propriété de dispenser très facilement une source d'énergie à longueur d'onde variable, d'une puissance: 10^5 à 10^6 watts, durée d'une impulsion: 10^{-8} à 10^{-12} secondes.
- lasers à semi-conducteurs. Nous ne donnerons aucune des caractéristiques relatives à ce type de lasers car elles varient énormément suivant la composition. Par ailleurs, leurs applications sont loin d'être inventoriées.

En résumé, les vastes applications des lasers permettent une étude des propriétés de certaines molécules dans des

champs allant de 400 à $47,000\text{ cm}^{-1}$!

En chimie, les lasers sont surtout utilisés en spectroscopie et en cinétique pour

- des déterminations précises de différentes fréquences optiques.
- des études sur - les propriétés optiques conventionnelles de certains composés: absorption, luminescence, résonance.
- les phénomènes de dissociation moléculaire ou de réactions en chaîne.
- la spectroscopie multiphotonique, l'effet Doppler.
- la relaxation en phase condensée.

sans oublier,

- l'évaluation de l'énergie vibrationnelle de certaines distributions moléculaires pendant les réactions chimiques
- l'étude des vitesses de transfert d'énergie électronique (154).

Concernant ce dernier point, mentionnons, qu'avec des temps de l'ordre de la nanoseconde et de la picoseconde, les lasers constituent l'instrument idéal pour fournir des informations sur les mécanismes de

- "recombinaison intersystème"
- relaxation vibrationnelle
- transfert, radiatif ou non, d'énergie vibrationnelle

- réorientation moléculaire de substances organiques en phase liquide et même cristalline (155).
- fluorescence sensibilisée
- "quenching" par des molécules à l'état singulet ou triplet (156)

b) Spectrofluorimètre - laser: Description du système

Le nom lui-même suggère déjà sa composition. Il s'agit d'un détecteur de fluorescence ayant un monochromateur comme élément dispersif de la lumière excitatrice émise par un laser.

Ce dispositif ou plutôt ses équivalents, commencent à être judicieusement utilisés par divers groupes de chercheurs (81, 157 à 161) pour étudier la fluorescence de molécules pigmentaires (81, 157 à 161).

En ce qui nous concerne, la source d'excitation est constituée de deux lasers:

- l'un à l'Hélium/Néon (He/Ne)
- l'autre à l'Hélium/Cadmium (He/Cd)

Nous nous servons de l'un ou l'autre

Les raisons de ce choix sont très simples:

le laser He/Ne émet à 632.8 nm

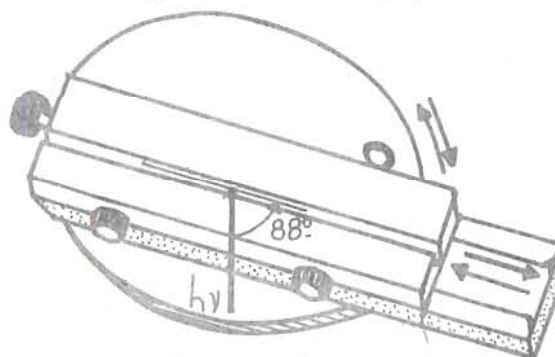
le laser He/Cd émet soit à 441.6 nm, soit à 325 nm.

C'est-à-dire dans les deux régions où la chlorophylle a présente ses maxima d'absorption.

Un schéma du montage (schéma 10) nous indique que le faisceau de lumière émise par un laser pénètre dans une chambre noire hermétique pour aller frapper notre échantillon. Cet échantillon qui peut être soit une solution de chlorophylle a, soit une lamelle de quartz portant des monocouches du pigment, est placée sur un disque rotatif approprié:

- porte cellule et cellule pour la chlorophylle en solution
- porte lamelle et lamelle pour la chlorophylle en monocouches.

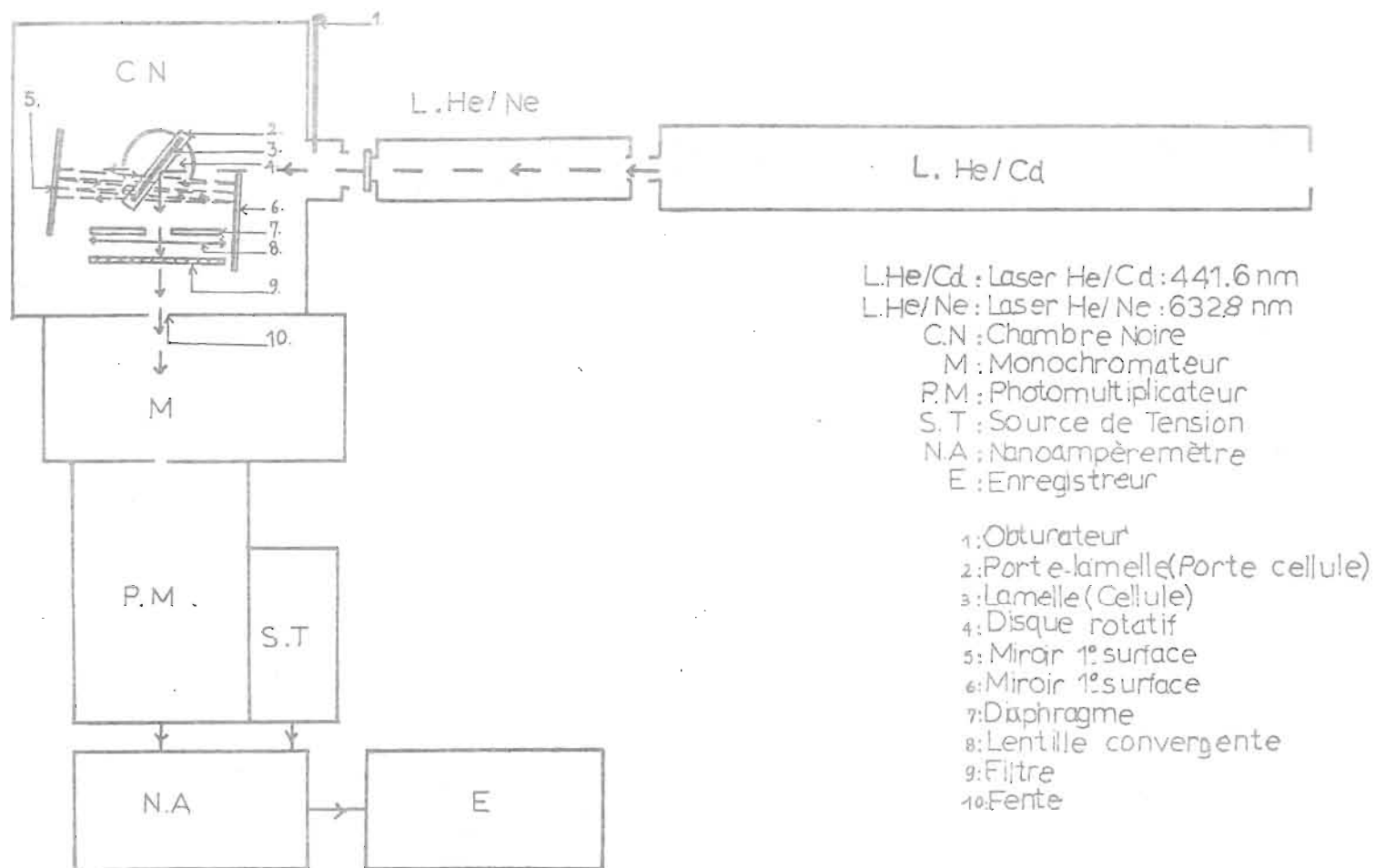
Schéma 11



Il permet de faire varier l'angle d'orientation de la lamelle par rapport au faisceau incident. (schéma 11)

Le support de la lamelle en plus d'être rotatif, se déplace latéralement ceci afin d'éviter que la lumière intense émise par le laser irradie toujours la même zone de monocouches. Après avoir traversé la cellule ou la lamelle, le faisceau du laser atteint un miroir de première surface; la lumière est réfléchiée, passe à nouveau à travers l'échan-

schéma:10



SPECTROFLUORIMETRE LASER

tillon et frappe un deuxième miroir (de première surface), placé presque parallèlement au premier. La lumière est ainsi réfléchie un grand nombre de fois à travers l'échantillon.

La fluorescence émise par notre substance est focalisée à l'aide d'une lentille convergente en verre, de distance focale 3.54 cm. Lorsque l'on étudie des monocouches de pigments, il est nécessaire d'intercaler entre la lamelle de quartz et la lentille, un diaphragme dont le rôle essentiel est de laisser passer les seuls faisceaux de lumière émise (non dispersante ou diffusée), qui présentent des spectres ayant des maxima les plus élevés possibles.

L'angle d'orientation de la lamelle de quartz par rapport à la direction du faisceau incident est très important. En effet, les molécules de chlorophylle en monocouches étant probablement orientées d'une manière précise, leur coefficient d'absorption va varier en fonction de cet angle. De nombreux spectres de fluorescence peuvent donc être obtenus à partir d'une seule lamelle suivant la position qu'elle occupe sur le support. L'inclinaison de la lamelle présente encore un avantage essentiel: Elle augmente la surface des pigments susceptibles de fluorescer: le diamètre du faisceau de lumière émis, au lieu de demeurer égal à celui de la lumière incidente du laser

(soit 1.5 mm pour laser He/Cd), du fait de la réflexion multiple dans la lamelle de verre inclinée, se trouve au moins multiplié par un facteur de 4!

Des expériences successives nous ont amenés à construire un diaphragme en métal percé d'une fente de 6 mm x 9 mm.

La lentille de verre, accolée au diaphragme concentre les rayons qu'elle reçoit exactement dans la fente d'un monochromateur fixé à la chambre noire.

Sur le trajet du faisceau convergent, un filtre a été placé afin d'éliminer toute lumière dispersante, et toute lumière ayant une longueur d'onde inférieure à 640 nm.

Les caractéristiques sont les suivantes:

Sharp cut off filter - 640 nm.

La lumière passe ensuite dans le monochromateur et atteint le photomultiplicateur placé dans une chambre refroidie à la glace sèche.

Les trois dispositifs: chambre noire, monochromateur, photomultiplicateur font corps ensemble et ne peuvent être déplacés malencontreusement.

Comme l'amplification assurée par le photomultiplicateur est proportionnelle à la tension appliquée à ses bornes, une source de tension variable et très stable pouvant atteindre facilement plus de 3,000 V a été raccordée à l'appareil.

Caractéristiques des éléments du dispositif:

- laser Hélium - Cadmium (laser He/Cd)

Modèle 185/285 - Puissance 75 mW

(Spectra Physics - California, U.S.A.)

Source continue de lumière cohérente émettant à 441.6 nm

mode transversal: TEM₀₀

diamètre du faisceau: 1.5 mm

divergence du faisceau: 0.5 milliradians à 441.6 nm

polarisation : > 99.9%

plan de polarisation : vertical à $\pm 5^\circ$

source de tension : voltage: 115 v/230 v $\pm 10\%$

fréquence: 50/60 Hertz

puissance: 1200 vA.

- laser Hélium - Néon (laser He/Ne)

Modèle 120 - Puissance 5 mW

(Spectra Physics - California, U.S.A.)

source continue de lumière cohérente émettant à 632.8 nm

mode transversal TEM₀₀

diamètre du faisceau: 0.65 mm

divergence du faisceau: 1.7 milliradians

polarisation du faisceau: > 99.9%

plan de polarisation: Vertical ajustable à $\pm 20^\circ$

source de tension : voltage: 115 v/120v

fréquence: 50/60 Hertz

puissance: 50 vA.

- Polariseur -

Modèle: 310-21

(Spectra Physics - California, U.S.A.)

Utilisable entre 400 - 700 nm

Coefficient d'extinction: 10^3

Transmission: > 98%

Précision sur la Rotation: $\pm 0.2^\circ$

Distorsion lors de la Transmission: $\frac{\lambda}{8}$

- Monochromateur

Modèle Ebert 0.25 meter .82-410

(Jarrell-Ash division; Fisher Scientific Company, Mass, U.S.A.)

distance focale: 0.25 m

élément dispersif: réseau de 2,360 lignes au mm

résolution: 3 Å à 313.1 nm

dispersion de la lumière: 0.2%

fentes: 150 μ

- Photomultiplicateur

Modèle EMI RC 50 M. Gencom division Varian

(Emi - New York, U.S.A.)

tube à cathode sensible rouge - type 9558 OB

Amplification 1.3×10^6

Sensibilité (typique): $\begin{cases} 150 \mu\text{A/L (cathode)} \\ 200 \text{ A/L (anode)} \end{cases}$

- Source de tension

Modèle: Power Supply Nimpac 105

(Velonex - California, U.S.A.)

Tension produite de 0 à 3000 volts; ajustable manuellement,
utilisée à 1040 volts

Précision: $\pm (1\% + 3 \text{ volts})$

Résolution: 200 mV

Stabilité: Variation $< 0.01\% + 100 \text{ mV/heure}$

- Nanoampèremètre

Modèle: EMI, type 911, Gencom division Varian

(Emi, New York, U.S.A.)

Courant mesurable $100\mu\text{A} - 1 \text{ nanoA}$.

Précision: 2%

Résolution: 10^{-4} Amp. sur l'échelle la plus sensible.

Cancellation du bruit de fond: $1 \text{ nanoA} - 10 \mu\text{A}$.

- Enregistreur

Modèle YEW 3043

Yokagawa Electric Works Ltd, Musashino-Shi, Japan

Précision: $\pm 0.25\%$ sur toute l'échelle

Résistance à l'entrée: $200 \text{ K}\Omega$ lorsque utilisé avec
un champ de 100 mV

Utilisation:

Pour évaluer la sensibilité de notre appareil et
la comparer à celle du Spectrophotomètre Perkin-Elmer,

différentes mesures ont été effectuées dans les deux cas. La figure 21 représente l'intensité relative de la fluorescence de la chlorophylle a, en solution, en fonction de sa concentration. Les résultats montrent que le système laser He/Cd est plus précis que le précédant, puisqu'il répond "qualitativement" à des concentrations mille fois plus faibles.

Quantitativement, il peut même déceler des concentrations de l'ordre de 10^{-12} M, (mais avec une si grande dilution, la sensibilité à utiliser ne permet pas d'éliminer la majeure partie de la lumière dispersante).

La figure 22 a été établie en utilisant le laser He/Ne. Ici encore, même si la puissance du laser est inférieure à celle du laser He/Cd, la sensibilité atteinte par ce dispositif est supérieure à celle obtenue par le spectrofluorimètre Perkin-Elmer.

Si l'on examine à présent les résultats obtenus à partir de monocouches de chlorophylle a, dans la figure 23, où la fluorescence de la chlorophylle a été tracée en fonction de la longueur d'onde, on remarque qu'il existe encore un avantage pour le spectrofluorimètre laser: son photomultiplicateur est relativement sensible dans le rouge.

L'utilisation de la spectrofluorimétrie laser, pour l'étude des spectres d'émission de la chlorophylle a pure

et des mélanges variables: chlorophylle a/β-carotène,
est très avantageuse. Elle va nous permettre en outre
d'évaluer - l'importance du transfert d'énergie

β-carotène - chlorophylle a

- le degré de quenching de la chlorophylle a
par le caroténoïde.

De plus, grâce à un polariseur de lumière

Modèle: 310-21

(Spectra Physics - California, U.S.A.)

Utilisable entre 400-700 nm

Coefficient d'extinction: 10^3

Transmission: >98%

Précision sur la Rotation: $\pm 0.2^\circ$

Distorsion lors de la Transmission: $\frac{\lambda}{8}$

adaptable sur nos deux lasers, une nouvelle série d'expé-
riences va apporter des renseignements supplémentaires con-
cernant le sujet, soit

- l'angle de polarisation de la fluorescence
de la chlorophylle a pure, en monocouches
- et celui du mélange β-carotène/chlorophylle a
dans différentes proportions, en monocouches
également.

Tableau 7

VERIFICATION DE LA LONGUEUR D'ONDE OBTENUE
AVEC LE MONOCHROMATEUR DU SPECTROFLUORIMETRE LASER

Résultats observés sur le monochromateur et sur l'enregistreur

Utilisation . d'une lampe au mercure "Low Pressure"

. de la lentille convergente

. fente 150 μ

Valeurs publiées (v_0) références (en nm)	Valeurs exérim. (v_1) obtenues (en nm)	Différence $v_0 - v_1$ (nm)
404.5	404.0	0.5
407.8	407.3	0.5
435.8	435.4	0.4
546.1	546.0	0.1
577.0	576.7	0.3
579.0	578.6	0.4
780.0	729.8	0.2
732.6	732.5	0.1

N.B.: Incertitude publiée dans le manuel d'instruction du monochromateur: ± 1 nm

(Toutes nos valeurs $v_0 - v_1$ sont inférieures à 1 nm)

CHAPITRE IV

PROCESSUS PHOTOPHYSIQUES

CHAPITRE IV: PROCESSUS PHOTOPHYSIQUES

IV.1. Spectroscopie U.V.-Visible de la chlorophylle a, du
 β -carotène, et du mélange chlorophylle a/ β -carotène

1. En solution: chlorophylle a, β -carotène,
chlorophylle a/ β -carotène.

. Nature des pigments et des solvants utilisés

- chlorophylle a: Sigma Chemical Company

St-Louis, MO, U.S.A.

Caractéristiques: Lot de 1 mg en ampoule scellée

conservé à l'obscurité et à une tempé-

rature inférieure à 0°C.

Sans chlorophylle b

Coefficients d'extinction ϵ : (162)

dans le diéthyléther ϵ_{662} :

$$8.4 \times 10^4 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$(\epsilon_{428}: 10.7 \times 10^4 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$$

dans le benzène ϵ_{666} :

$$7.82 \times 10^4 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

- chlorophylle b: Sigma Chemical Company

St-Louis, MO, U.S.A.

Caractéristiques: Lot de 1 mg en ampoule scellée

conservé à l'obscurité et à une tempé-

rature inférieure à 0°C.

Sans chlorophylle a

Coefficients d'extinction dans le diéthyléther
(162):

$$\epsilon_{664}: 5.03 \times 10^4 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{452}: 15.1 \times 10^4 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

- β -carotène: Sigma Chemical Company
St-Louis, MO, U.S.A.

Caractéristiques: type I "trans"

synthétisée et sous forme cristalline

Lot conservé à l'obscurité et à une température inférieure à 0°C.

Coefficients d'extinction (163)

dans le diéthyléther:

$$\epsilon_{452}: 1.34 \times 10^5 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

dans le benzène:

$$\epsilon_{465}: 1.42 \times 10^5 \ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

N.B.: Cette forme de β -carotène synthétisé, a été préférée à celle obtenue par extraction à partir de carottes, pour sa plus grande stabilité.

- diéthyléther: Analar B.D.H., P. Qué.

- benzène : Fisher Scientific Company
sans Thiophène - 99% pur

Différents spectres d'absorption ont été pris concernant la chlorophylle a, la chlorophylle b, le β -carotène, ou le mélange chlorophylle a/ β -carotène dans différentes proportions avec l'acide arachidique ou l'arachidate de cadmium et dans des solvants tels que le diéthyléther ou le benzène.

- acide arachidique: Eastman Organic Chemical Company
New York, U.S.A.

Caractéristique: synthétisé.

- chlorure de cadmium: Baker Analyzed reagent. Baker Chemical
Company, New Jersey, U.S.A.

Caractéristique: A.C.S.

outre l'avantage de fournir des renseignements sur le degré de pureté des pigments et des solvants employés, les spectres nous permettaient de calculer la concentration précise des solutions utilisées pour les expériences de spectrofluorimétrie.

Les calculs sont effectués à partir de la loi de Beer-Lambert, à savoir:

Densité optique: $D.O. = \epsilon.C.\ell$

où ϵ = coefficient d'extinction molaire du
pigment choisi et dans un solvant
déterminé

en $\ell \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

C = concentration du pigment en moles \times litre⁻¹

ℓ = longueur du parcours optique en cm.

Les spectres sont comparables à ceux des figures 9 et 10 dans le diéthyldéther et à ceux des figures 10 et 11 dans le benzène. En ce qui concerne les mélanges chlorophylle a / β -carotène, la concentration de la chlorophylle a est toujours maintenue constante à $\approx 10^{-8}$ M (afin d'éviter le "self-quenching" de la fluorescence). Pour de faibles concentrations de β -carotène le solvant employé est le diéthyldéther. Pour des concentrations supérieures de β -carotène (concentration $> 10^{-7}$ M) le solvant est le benzène (fig. 12, 13).

2. A l'état solide: chlorophylle a

A partir de solutions relativement concentrées de chlorophylle a dans le diéthyldéther ($\approx 10^{-4}$ M) des films de pigment sont préparés sur des lamelles de quartz préalablement lavées à l'acide chromique.

On dépose à l'aide d'une microseringue une quantité de solution (0.5 cc) que l'on fait glisser le long de la lamelle inclinée de manière à éviter la formation de taches ou auréoles de pigment au cours de l'évaporation.

Les spectres d'absorption de tels films (fig. 14) nous montrent un déplacement bathochrome des pics maxima par rapport à ce qui se produit en solution.

3. A l'état de monocouches

a) Calibration du bain

Avant de réaliser des monocouches, le bain a été calibré

fig.9

SPECTRE D'ABSORPTION d'une SOLUTION de CHLOROPHYLLE a /DI-ETHYL-ETHER

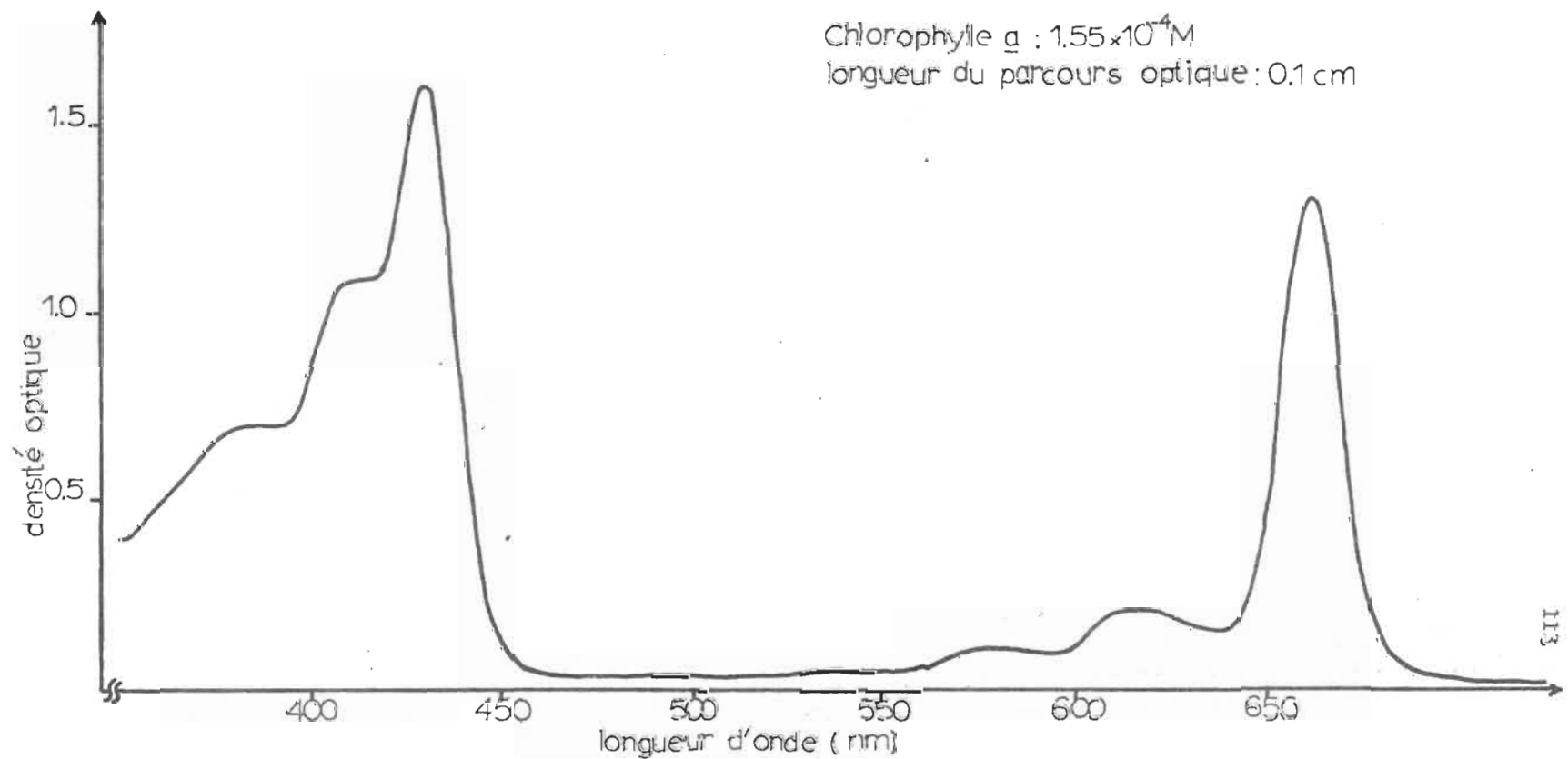


fig.10

SPECTRE D'ABSORPTION d'une SOLUTION de β -CAROTENE / DI-ETHYL-ETHER.

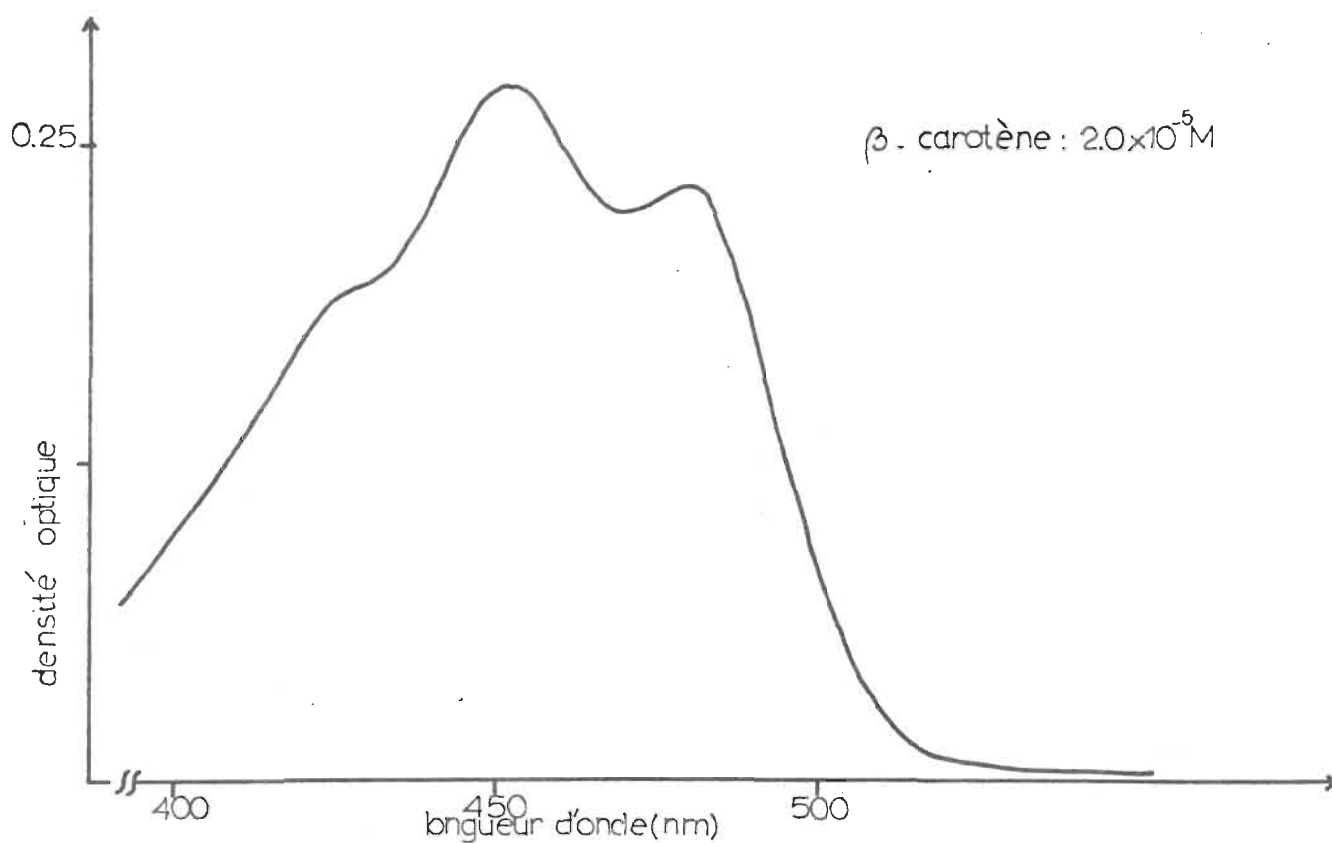
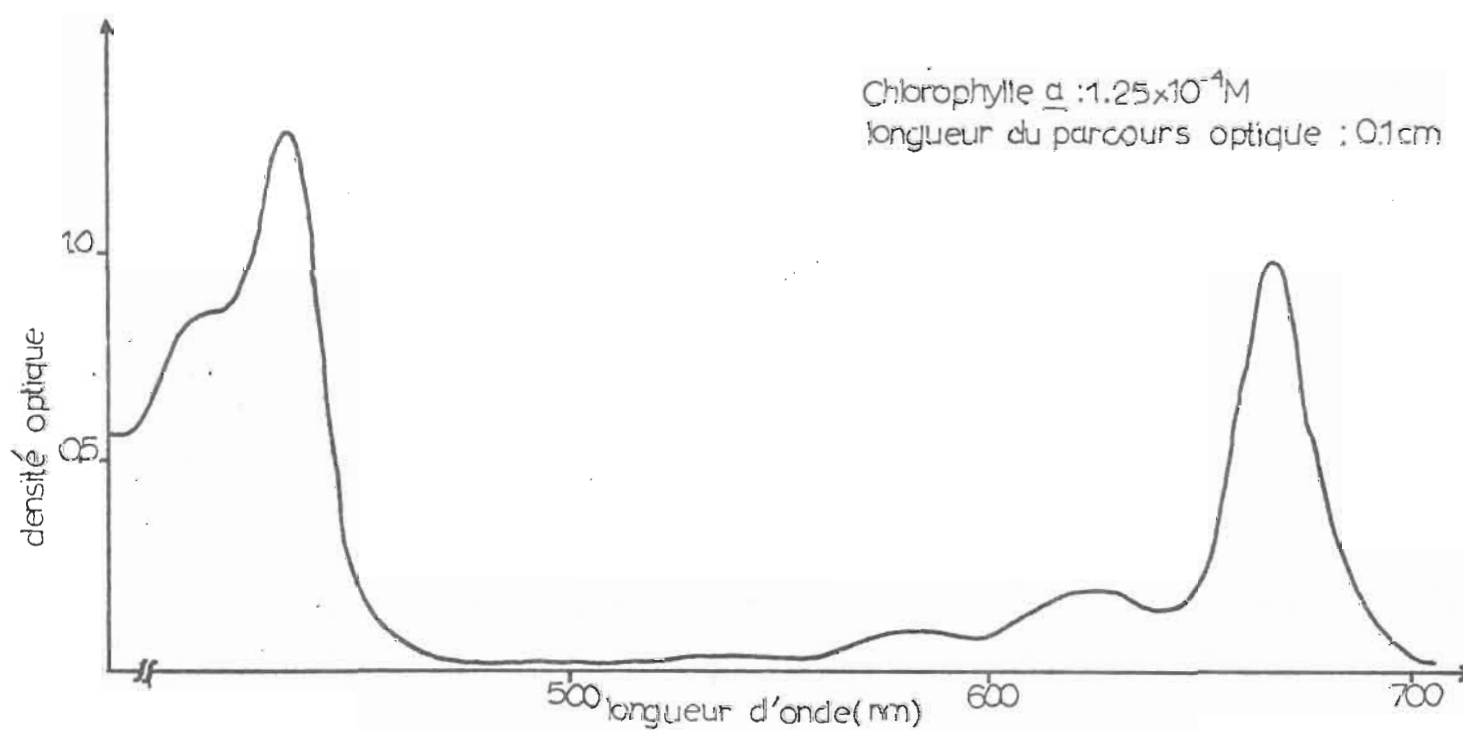


fig.11

SPECTRE D'ABSORPTION d'une SOLUTION de CHLOROPHYLLE a / P_BENZENE



SPECTRE D'ABSORPTION d'une solution de β .CAROTENE/BENZENE

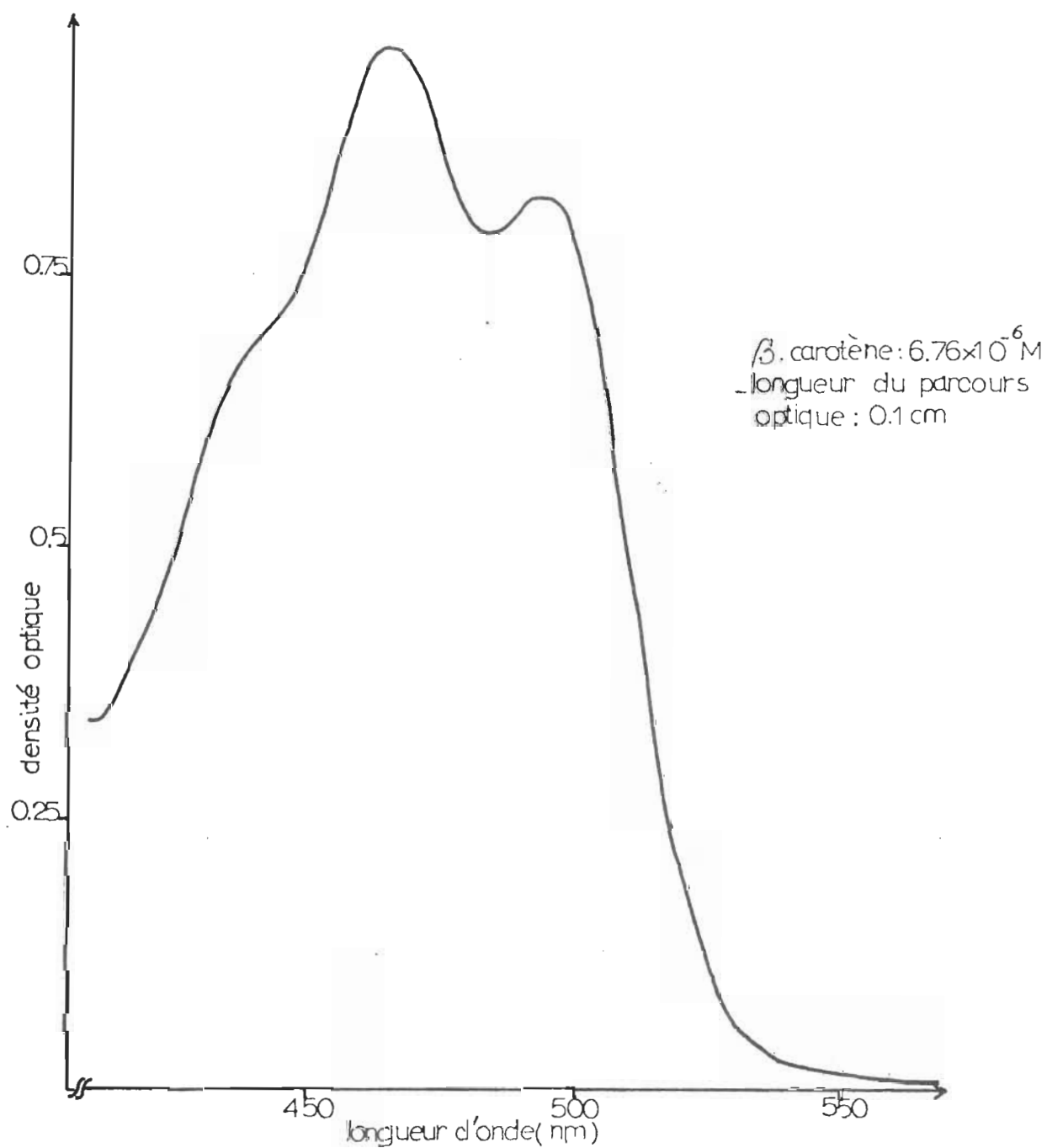


fig. 13

SPECTRE D'ABSORPTION du MELANGE CHLOROPHYLLE α - β .CAROTENE en SOLUTION

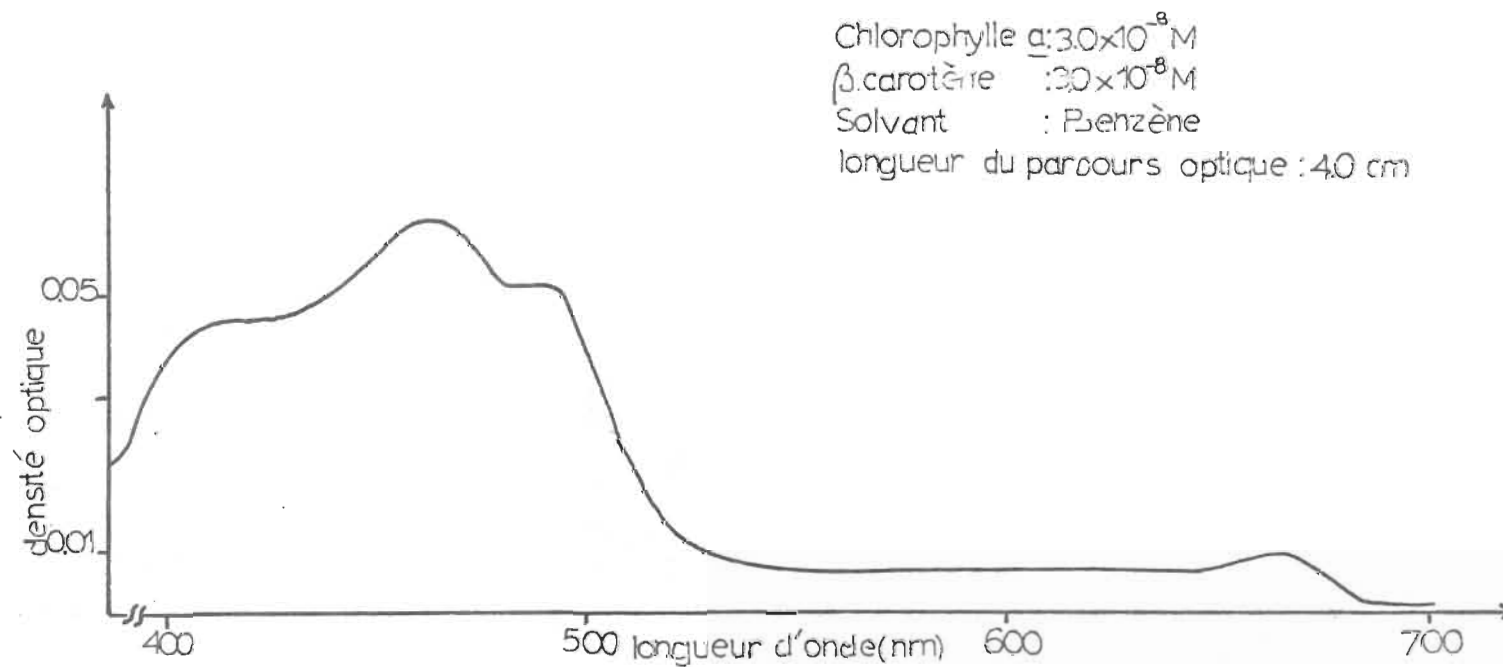
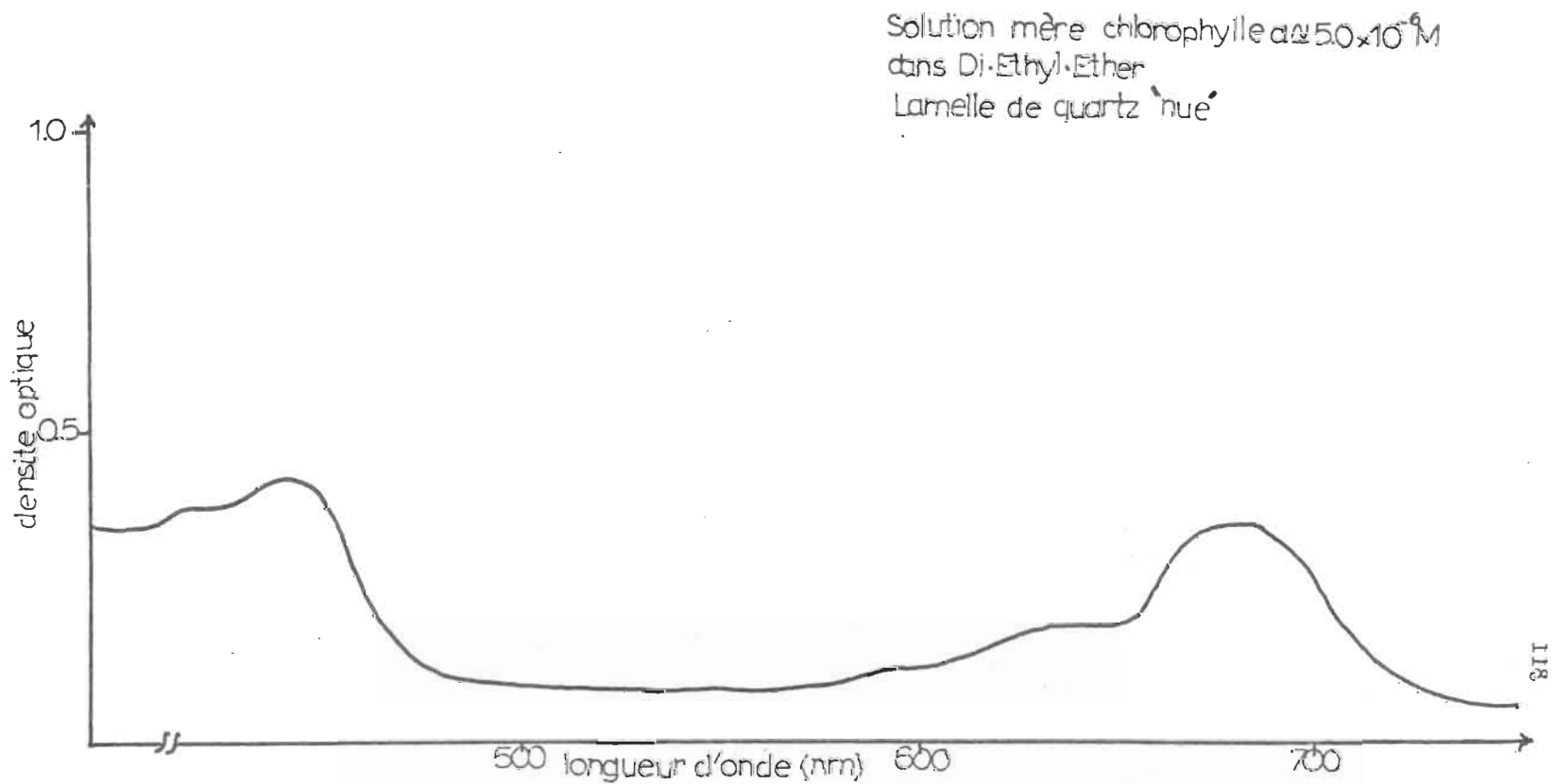


fig.14

SPECTRE D'ABSORPTION d'un FILM de CHLOROPHYLLE a sur lamelle de quartz



(chapitre II.2.4) fig.6) et les courbes de pression de surface pour l'acide arachidique, la chlorophylle a, le β -carotène ont été déterminées.

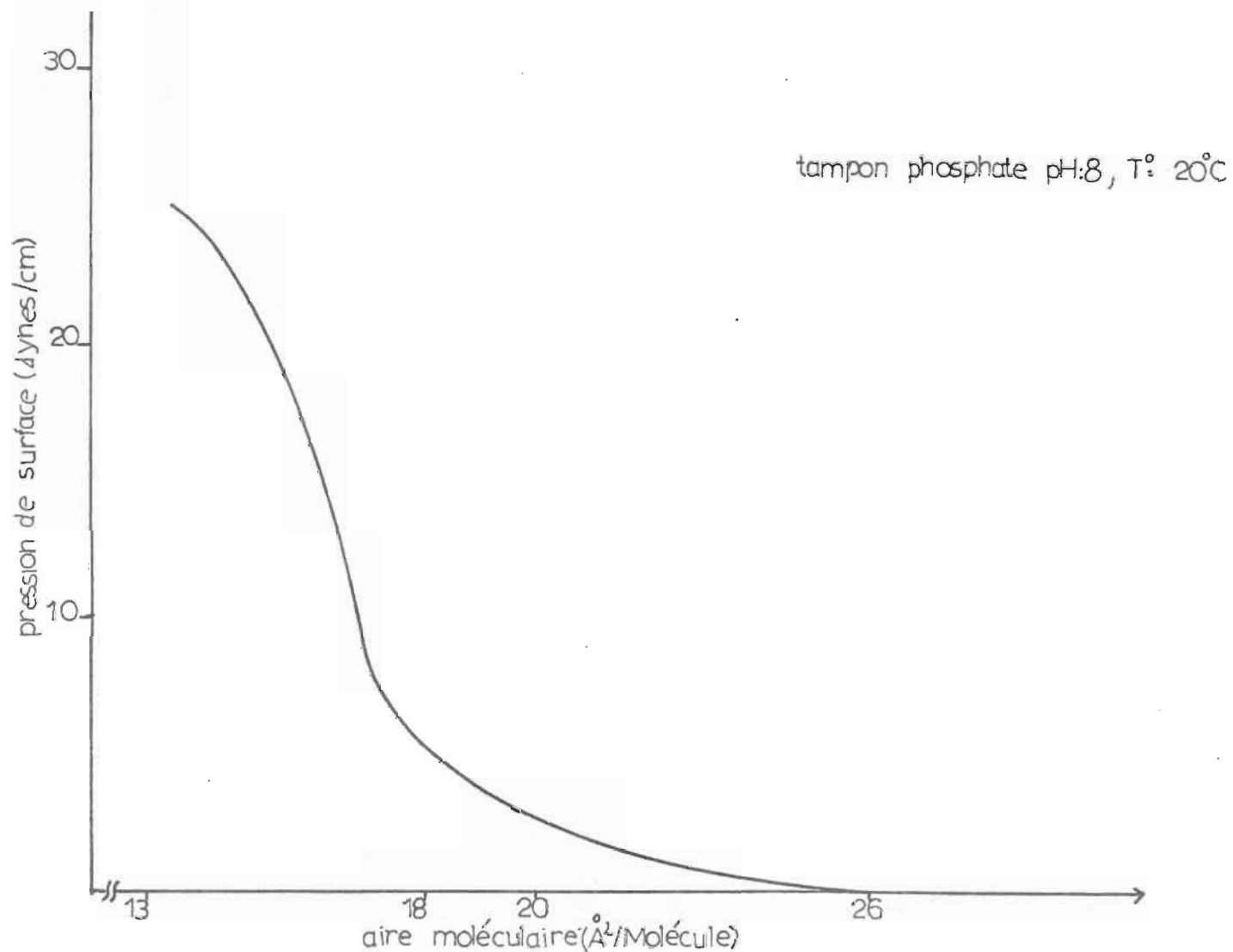
Les résultats obtenus sont conformes à ceux de la littérature (18 à 20, 164)(fig. 6, 7, 15).

b) Conditions d'expérience

- H_2O tridistillée - tension de surface ≈ 66 dynes
- conductivité $< 1 \mu\Omega^{-1}$
- chlorophylle a : A partir d'une solution mère de concentration connue
 $\approx 10^{-4} M$, dans le diéthyléther ou dans le benzène,
 déposition de 0.1 cc
 Nombre de molécules à la surface du bain
 $\approx 10^{16}$ molécules
 Sous-phase: H_2O tridistillée, tampon phosphate
 $Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 \approx 10^{-4} M$
 pH: 7.8 - 8.0
 T^0 : $23^\circ C$
 Zone de collapse pour
 - . une aire moléculaire $< 100 \text{ \AA}^2/\text{Molécule}$
 - . une pression de surface $> 21 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$
- acide arachidique: Solution mère $\approx 10^{-3} M$, dans le benzène
 Nombre de molécules à la surface du bain
 $\approx 10^{16}$ molécules

fig.15

COURBE de PRESSION de SURFACE du β -CAROTENE sur H_2O tridistillée



Sous-phase: H_2O tridistillée, milieu HCl :

$$1 \times 10^{-2} M$$

$$pH \approx 2.0$$

$$T^0: 22.5^{\circ}C$$

Zone de collapse pour

$$\cdot \text{ une aire moléculaire } < 19 \text{ \AA}^2/\text{Molécule}$$

$$\cdot \text{ une pression de surface } > 28 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$$

Des courbes de pression de surface de l'acide arachidique déposé

sur une sous phase H_2O tridistillée, $CdCl_2 \approx 10^{-4} M$

$$pH \approx 8.0$$

$$T^0 = 23^{\circ}C$$

ont été prises et comparées avec les précédentes: Elles sont semblables

- β -carotène : Solution mère $\approx 10^{-3} M$ dans benzène

Nombre de molécules à la surface du bain

$$\approx 10^{16} \text{ molécules}$$

Sous-phase: H_2O tridistillée, tampon phosphate

$$pH \approx 8.0$$

$$T^0 = 22^{\circ}C$$

Zone de collapse pour une aire moléculaire

$$< 14 \text{ \AA}^2/\text{Molécule}$$

Zone de collapse pour une pression de surface

$$> 23 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$$

Le film est très instable lors de la compression des molécules.

c) Monocouches de pigments

Seules les lamelles dont le rapport de déposition de l'acide arachidique, ou du pigment choisi est supérieur à 85% ont été conservées pour fins d'interprétation.

- monocouches de chlorophylle a

Elles sont réalisées sur des lamelles de quartz préalablement recouvertes de cinq (5) monocouches d'arachidate de cadmium sur chacune des faces, de manière à faciliter leur déposition (voir chapitre III.2.2).

Une pression de surface de $20 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$ est maintenue constante lors de l'immersion de la lamelle.

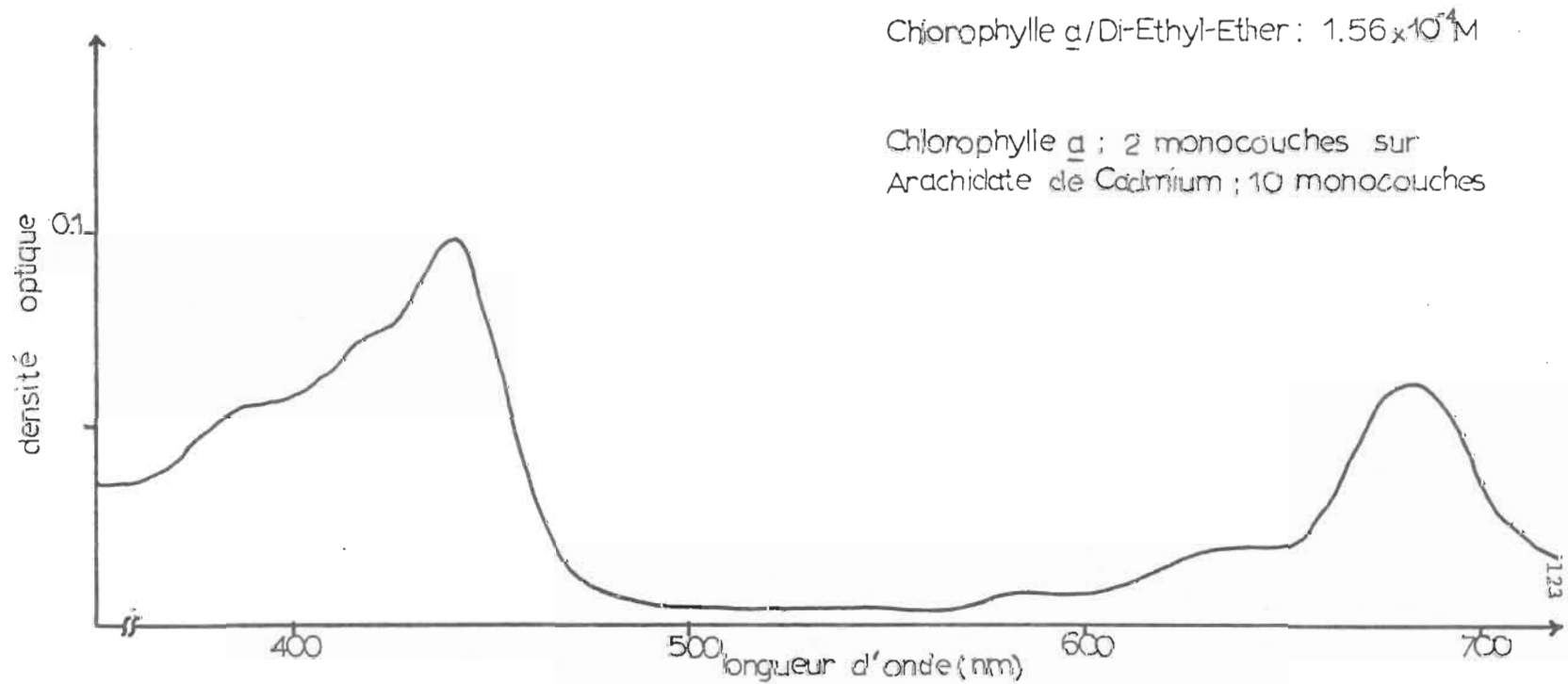
L'étude des spectres d'absorption de la chlorophylle a sous forme de monocouches nous montre un déplacement bathochrome des maxima tel que prévu (par rapport aux spectres d'absorption des solutions)(fig. 16).

- monocouches de β -carotène

Le β -carotène étant très difficile à déposer, même sur des lamelles recouvertes d'arachidate de cadmium, il a été nécessaire d'établir les proportions d'un mélange idéal acide arachidique: β -carotène à partir duquel se feraient les études de monocouches. En effet, l'acide arachidique plus polaire que le caroténoïde a la propriété de stabiliser les pigments photosynthétiques d'où son utilisation dans la technique des monocouches.

fig.16

SPECTRE D'ABSORPTION CHLOROPHYLLE a en MONOCOUCHE



A partir de solutions de β -carotène dans le benzène, à des concentrations $\approx 10^{-3}M$, divers mélanges ont été étudiés et leurs courbes de pression de surface comparées.

- β -carotène: Acide Arachidique	1:1
- β -carotène: Acide Arachidique	1:2
- β -carotène: Acide Arachidique	1:4
- β -carotène: Acide Arachidique	1:5

Conformément au résultat obtenu par Pincus (165) le mélange

1 β -carotène: 4 Acide Arachidique semble idéal et la déposition est relativement aisée comparée aux autres conditions expérimentales.

Cette conclusion s'appuie sur les données fournies par Gaines (166) concernant l'évaluation de la courbe de pression de surface de mélanges en monocouches: (Tableau 8, Fig. 17 et 18)

Pour une monocouche composée de deux substances immiscibles (en l'occurrence: l'Acide Arachidique et le β -carotène), les propriétés sont celles des deux composants pris individuellement. Ainsi le film monomoléculaire peut être considéré comme constitué de deux monocouches séparées en équilibre l'une avec l'autre, et pour un mélange idéal, nous aurons:

$$A_{1,2} = N_1 \cdot A_1 + N_2 \cdot A_2$$

où $A_{1,2}$ = aire moléculaire moyenne dans la monocouche mixte

N_1 et N_2 = fractions molaires des deux composants

A_1 et A_2 = aires moléculaires des deux composants

Tableau 8: Comparaison des courbes de pression de surface (théorique et expérimentale) pour le mélange "1 β -carotène: 4 Acide Arachidique" dans le benzène.

Pression de Surface Π dynes \times cm^{-1}	Aire moléculaire du β -carotène (Tampou phosphate) (valeur théorique) $\text{\AA}^2/\text{Molécule}$	Aire moléculaire de Acide Arachidique ($\text{CdCl}_2: 10^{-4}\text{M}$) (valeur théorique) $\text{\AA}^2/\text{Molécule}$	Aire moléculaire du mélange idéal (valeur théorique) $\text{\AA}^2/\text{Molécule}$	Aire moléculaire du mélange idéal. (résultat expérimental) $\text{\AA}^2/\text{Molécule}$
28		19.5		
22	14.7	19.75	18.7	19.1
20	15.2	20.0	19.0	19.4
16	16	20.3	19.4	19.9
12	16.5	22.0	20.1	21.3
8	17.1	23.85	22.5	22.9
6	17.65	24.8	23.4	23.65
2	20.5	26.6	25.4	25.6
0	26.	27.5	27.2	27.5

N.B.: Pour les valeurs expérimentales figurant dans ce tableau, une moyenne de cinq lectures a été calculée à partir de résultats semblables à ceux obtenus au tableau 9.

Tableau 9: Courbe de pression de surface du mélange β -carotène:Acide Arachidique, 1:4.sur sous-phase: $\text{CdCl}_2: \approx 10^{-4} \text{ M}$ β -carotène: $1.23 \times 10^{-3} \text{ M}$ Acide Arachidique: $4.91 \times 10^{-3} \text{ M}$ Nombre de molécules déposées: 7.39×10^{16} moléculesSensibilité de l'appareil: $0.41 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1} \times \text{degré}^{-1}$

Précision des mesures: Mesures faites au demi-degré de rotation près

 $\approx 0.2 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$

Erreurs des mesures < 10%

Surface (\AA^2)	Aire moléculaire (\AA^2)	Degré de rotation	Pression de surface ($\text{II dynes} \times \text{cm}^{-1}$)
213×10^{16}	28.8	0	0
206	27.9	1	0.41
198	26.8	2	0.8
191	25.8	3.5	1.4
184	24.9	7.5	3.1
176	23.8	13	5.3
169	22.9	19.5	8
162	21.9	25	10.25
154	20.8	30.5	12.5
147	19.9	40.5	16.6
140	18.9	46	18.9

fig.17

COURBES de PRESSION de SURFACE de mélanges β .CAROTENE:ACIDE ARACHIDIQUE

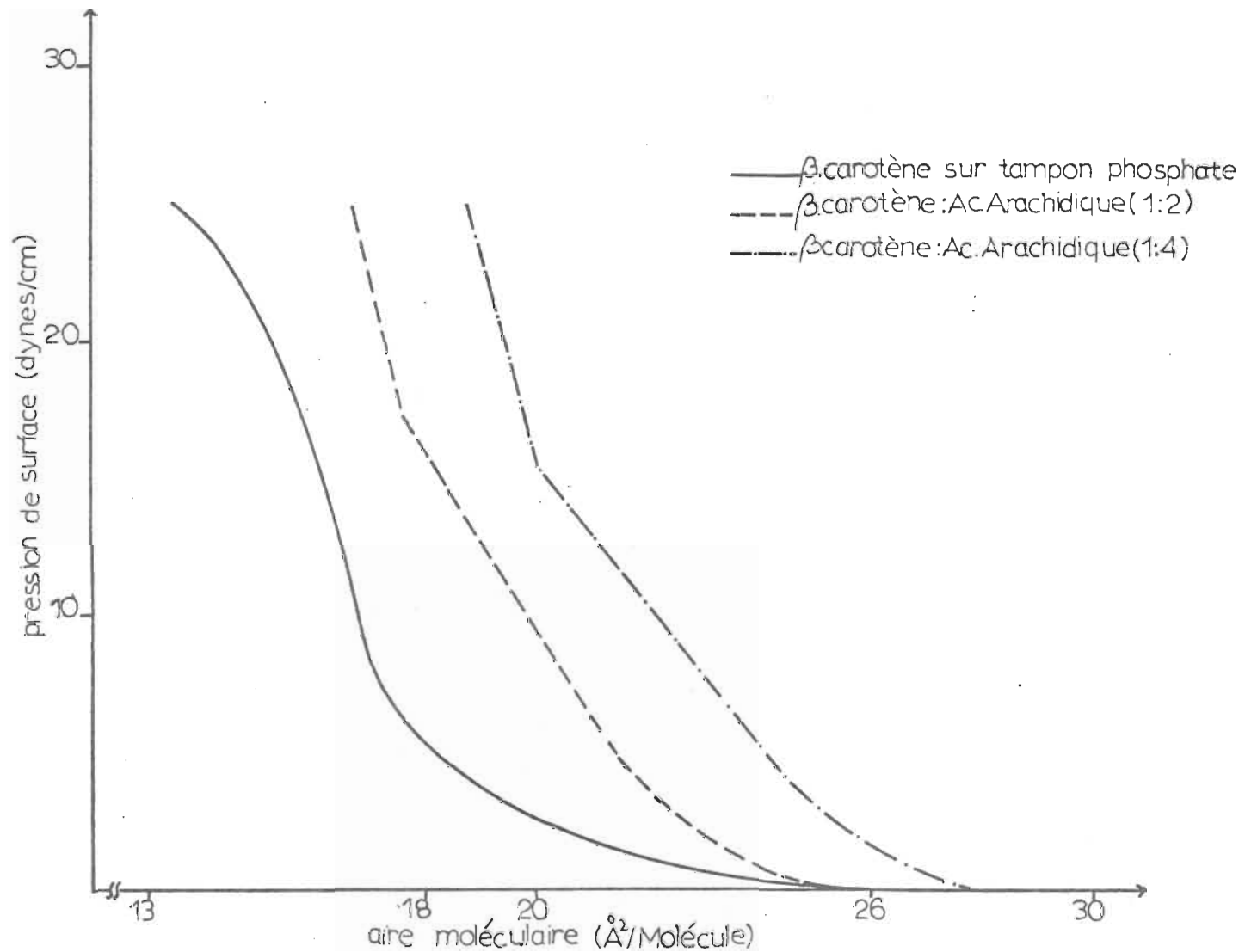
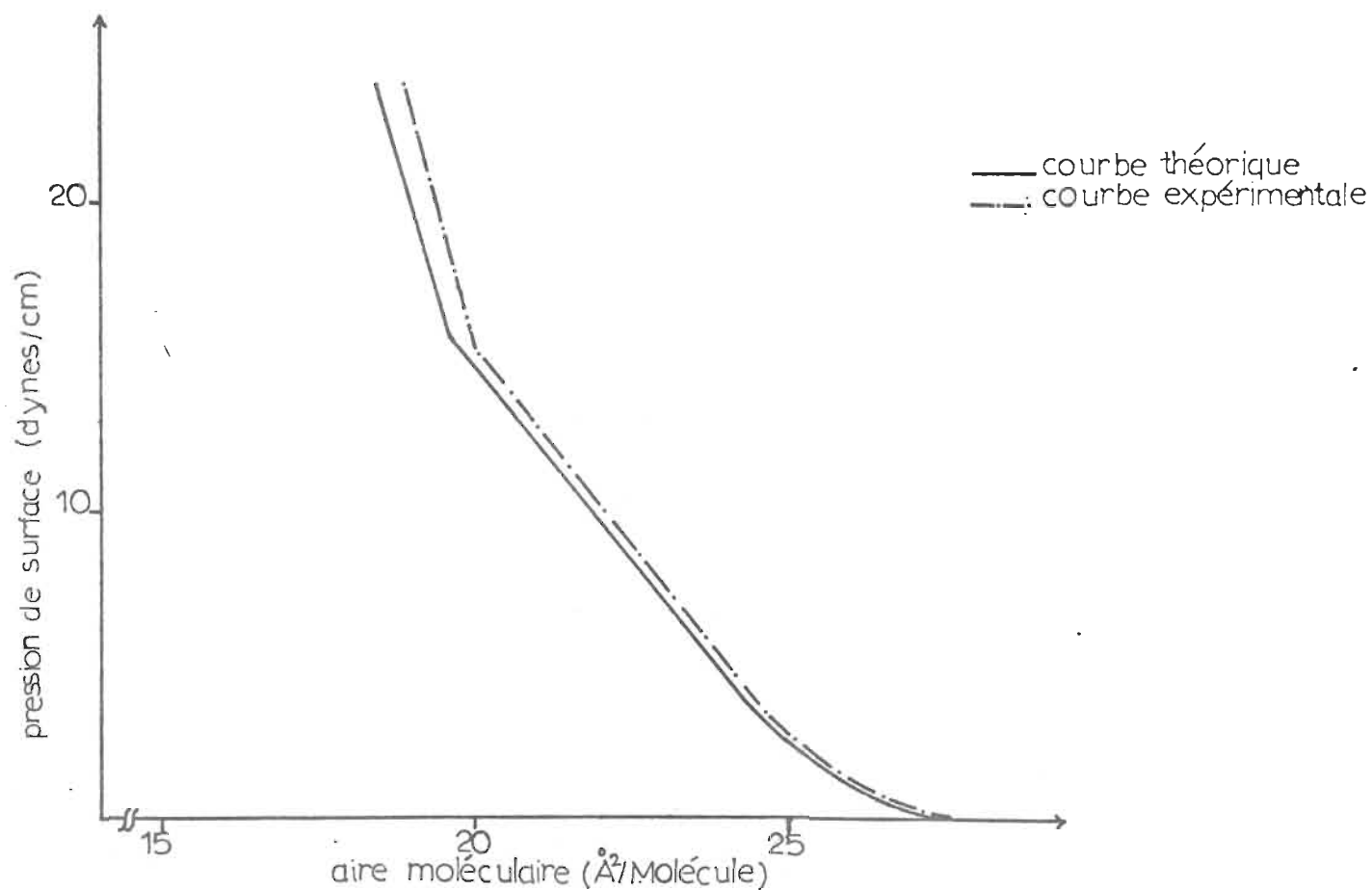


fig.18

COURBE de PRESSION de SURFACE du
mélange β CAROTENE:ACIDE ARACHIDIQUE
(1:4)



pour des monocouches individuelles, à la même pression de surface.

Concernant nos résultats, lorsque la pression de surface imposée aux molécules du mélange est supérieure à $19 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$, le film devient instable et les mesures subséquentes ne sont plus aussi rigoureuses.

A partir des courbes de pression de surface, obtenues expérimentalement, du mélange idéal: "1 β -carotène: 4 acide arachidique", et de l'acide arachidique, il est possible d'évaluer la courbe de pression de surface du β -carotène seul sur la même sous-phase. Les résultats confirment ceux de la fig. 11 contrairement à ce qui est affirmé dans la publication (165).

Le spectre d'absorption du mélange β -carotène: acide arachidique, en monocouches (fig. 19), montre un déplacement bathochrome de 25 nm par rapport aux solutions de pigments dans le benzène.

Les dépositions se sont effectuées à une pression de surface constante de $18 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$.

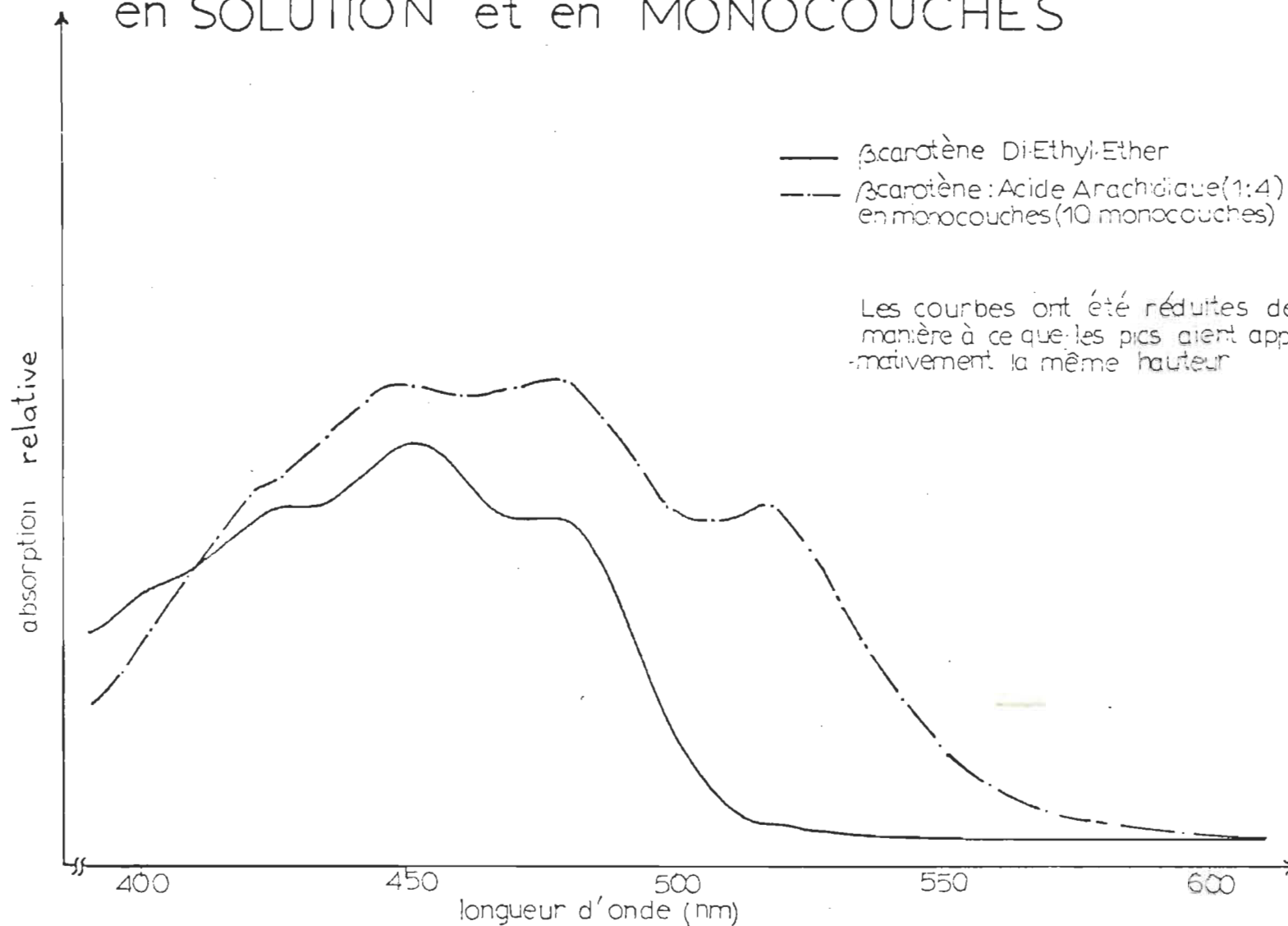
- monocouches de mélanges: chlorophylle a; β -carotène: acide arachidique. Elles sont réalisées à partir de solutions mères dans lesquelles la proportion des divers pigments variait tout en respectant le rapport:
1 β -carotène: 4 acide arachidique.

Exemple: acide arachidique: β -carotène: chlorophylle a

$$1 \quad : \quad \frac{1}{4} \quad : \quad \frac{1}{10}$$

fig 19

SPECTRES D'ABSORPTION du β .CAROTENE en SOLUTION et en MONOCOUCHEs



soit β -carotène: $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$

Acide arachidique: $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$

Chlorophylle a: $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$

Pression de surface lors de la déposition: $18 \text{ dynes} \times \text{cm}^{-1}$,
déterminée après avoir tracé la courbe de pression de surface
relative au mélange.

Les spectres d'absorption de telles solutions mixtes présentent les propriétés suivantes:

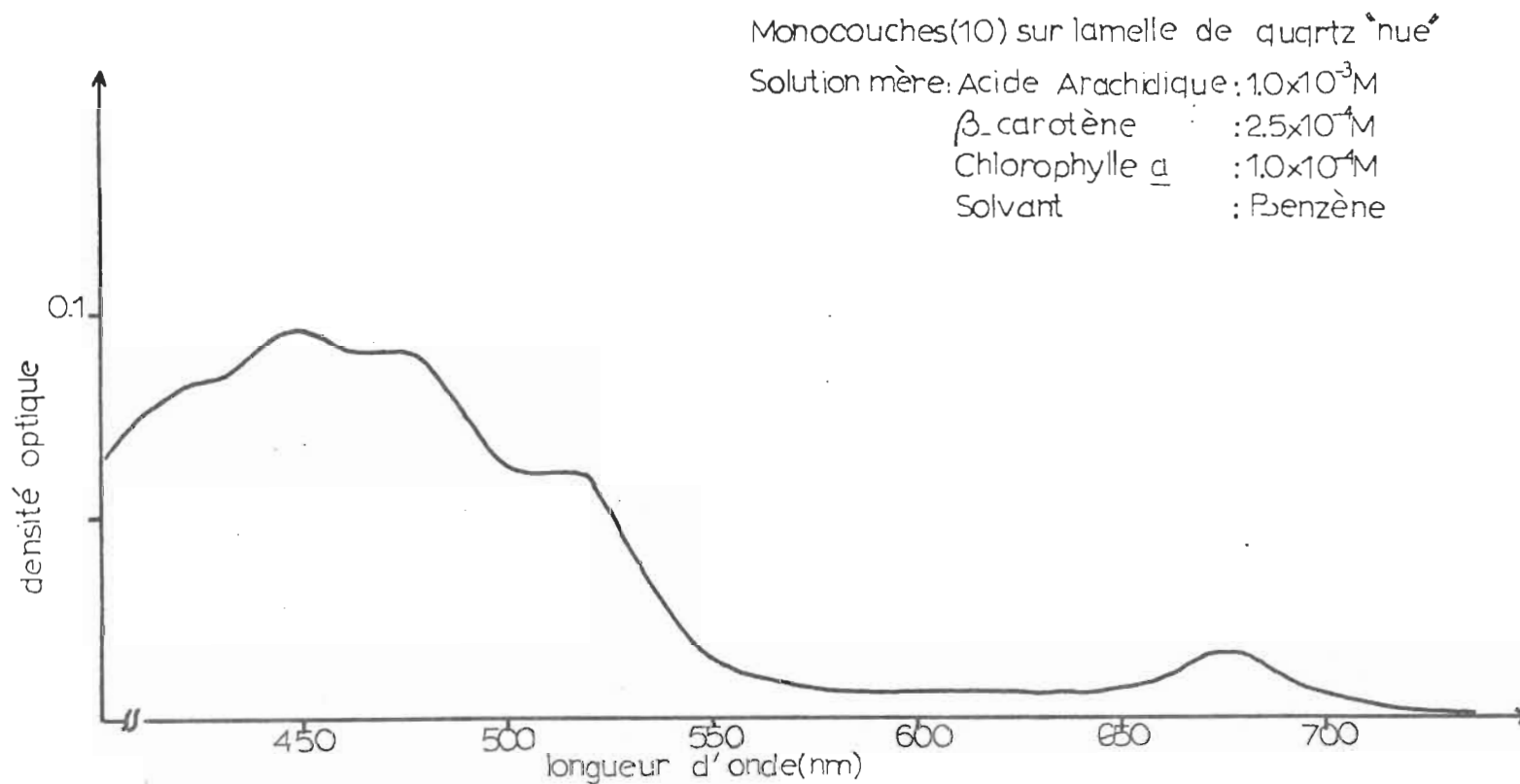
Il existe un maximum d'absorption. dans le rouge à cause
de la présence de chlorophylle a

et . dans le bleu, entre

400 et 550 nm, à cause des deux pigments β -carotène et
chlorophylle a. Il apparaît aussi que les déplacements
bathochromes qui existent pour des monocouches de chloro-
phylle a seule, semblent réduits en présence de β -carotène.
(fig. 20).

fig.20

SPECTRE D'ABSORPTION du MELANGE Acide Arachidique/ β -carotène/Chlorophylle a en MONOCOUCHEs



IV.2. Luminescence à l'aide des spectrofluorimètres Laser et Perkin-Elmer

1. Détermination et comparaison de la sensibilité des deux systèmes

L'intensité de fluorescence de diverses solutions de chlorophylle a dans le diéthyldéther a été évaluée aux spectrofluorimètres:

Perkin-Elmer MPF2A

laser He/Cd (441.6 nm)

laser He/Ne (632.8 nm)

Les concentrations de pigment varient de 10^{-13} M à 10^{-3} M.

Dans chacun des cas le maximum de fluorescence, pour une concentration donnée, est comparé au maximum de fluorescence d'une solution de chlorophylle b servant de référence.

Concentration de la solution de chlorophylle b dans le diéthyldéther: 4.0×10^{-7} M. Les valeurs des intensités relatives de fluorescence de la chlorophylle a, en fonction de la concentration figurent dans des tableaux tels que les tableaux 10, 11, par exemple.

La totalité des résultats nous a permis de tracer les figures 21, 22, 23, pour les trois types d'appareillage, et il est facile de constater l'avantage du système laser qui permet de détecter des intensités de fluorescence de solutions aussi peu concentrées que 5.0×10^{-12} M !

2. Détermination de la zone de "Self-Quenching" de la chlorophylle a

A partir d'une certaine concentration de pigments chlorophylliens

Tableau 10: Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle a en fonction de la concentration.
 Mesures faites à l'aide du spectrofluorimètre laser He/Ne
 λ excitation: 632.8 nm.

Nature et Normalité des solutions	log. concentration	Absorption à 633 nm		Fluorescence (au maximum)		$\frac{I_F}{I_0}$	$\log \frac{I_F}{I_0}$
		Référence	Echantillon	Référence I_{0cm}	Echantillon I_{Fcm}		
chlorophylle <u>b</u> (référence) $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	3 μ A: 24.8	3 μ A : 24.8	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.99 \times 10^{-10} M$	-9.7	9.3×10^{-3}	-	3 μ A: 24.8	100 NanoA : 1.5 3 μ A : 0.05	2×10^{-3}	- 2.7
chlorophylle <u>a</u> $1.99 \times 10^{-8} M$	-7.83	9.3×10^{-3}	5.0×10^{-4}	3 μ A: 24.8	1 μ A : 5.9 3 μ A : 1.97	8×10^{-2}	- 1.09
chlorophylle <u>b</u> $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	3 μ A: 25.0	3 μ A : 25.0	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.99 \times 10^{-7} M$	-6.7	9.3×10^{-3}	1.5×10^{-3}	3 μ A: 25.0	10 μ A : 5.8 3 μ A : 19.25	0.77	- 0.11
chlorophylle <u>a</u> $1.45 \times 10^{-5} M$	-4.84	9.3×10^{-3}	0.2	3 μ A: 25.0	100 μ A : 9.8 3 μ A : 327.5	13.1	1.11
chlorophylle <u>b</u> $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	3 μ A: 24.9	3 μ A : 24.9	1.0	0
chlorophylle <u>a</u> $1.55 \times 10^{-4} M$	-3.81	9.3×10^{-3}	1.6	3 μ A: 24.9	100 μ A : 3.6 3 μ A : 119.5	4.8	0.68

N.B.: Absorption à 633 nm présentée en terme de densité optique d'un échantillon placé dans une cellule de 1.0 cm de parcours optique.

Tableau 11: Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle a en fonction de la concentration.

Mesures faites à l'aide de spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF-2A

λ excitation: 633 nm

Nature et Normalité de la solution	log. concentration	Absorption à 633 nm		Fluorescence (au maximum)			
		Référence	Echantillon	Référence I_0 cm	Echantillon I_F cm	$\frac{I_F}{I_0}$	$\log \frac{I_F}{I_0}$
chlorophylle <u>b</u> (référence) $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	sens 6: 47.9	sens 6: 47.9	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.99 \times 10^{-10} M$	-9.70	9.3×10^{-3}	-	sens 6: 47.9	sens 6:	-	-
chlorophylle <u>a</u> $1.49 \times 10^{-8} M$	-7.83	9.3×10^{-3}	5.0×10^{-4}	sens 6: 47.9	sens 6: 4.3	0.09	-1.04
chlorophylle <u>b</u> (référence) $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	sens 6: 47.9	sens 6: 47.9	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.99 \times 10^{-7} M$	-6.70	9.3×10^{-3}	1.5×10^{-3}	sens 6: 47.9	sens 6: 38.3	0.8	-0.1
chlorophylle <u>b</u> (référence) $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	sens 6: 46.5	sens 6: 46.5	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.45 \times 10^{-5} M$	-4.84	9.3×10^{-3}	0.2	sens 6: 46.5	sens 3: 22.5 sens 6: 608	13.1	1.11
chlorophylle <u>b</u> (référence) $4.0 \times 10^{-7} M$	-6.40	9.3×10^{-3}	9.3×10^{-3}	sens 6: 46.5	sens 6: 46.5	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.55 \times 10^{-4} M$	-3.81	9.3×10^{-3}	1.6	sens 6: 46.5	sens 3: 8.2 sens 6: 221.6	4.76	0.68

N.B.: - sens. (3) = sensibilité (3)

- Absorption à 633 nm présentée en terme de densité optique d'un échantillon placé dans une cellule de 1.0 cm de parcours optique.

fig.21

INTENSITE RELATIVE de FLUORESCENCE de la CHLOROPHYLLE a, fonction de la CONCENTRATION

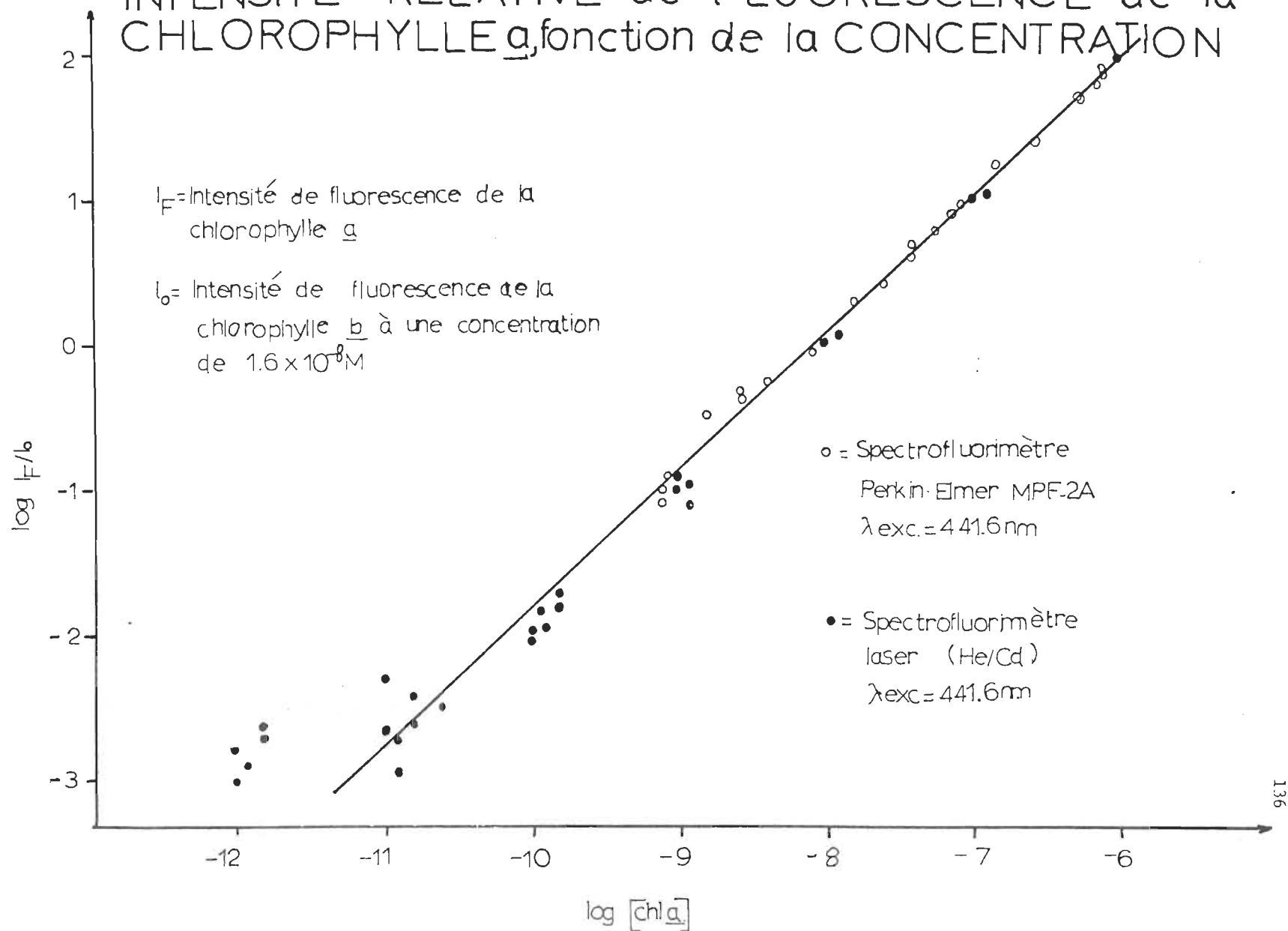


fig. 22

INTENSITE RELATIVE de FLUORESCENCE de la CHLOROPHYLLE a, fonction de la CONCENTRATION

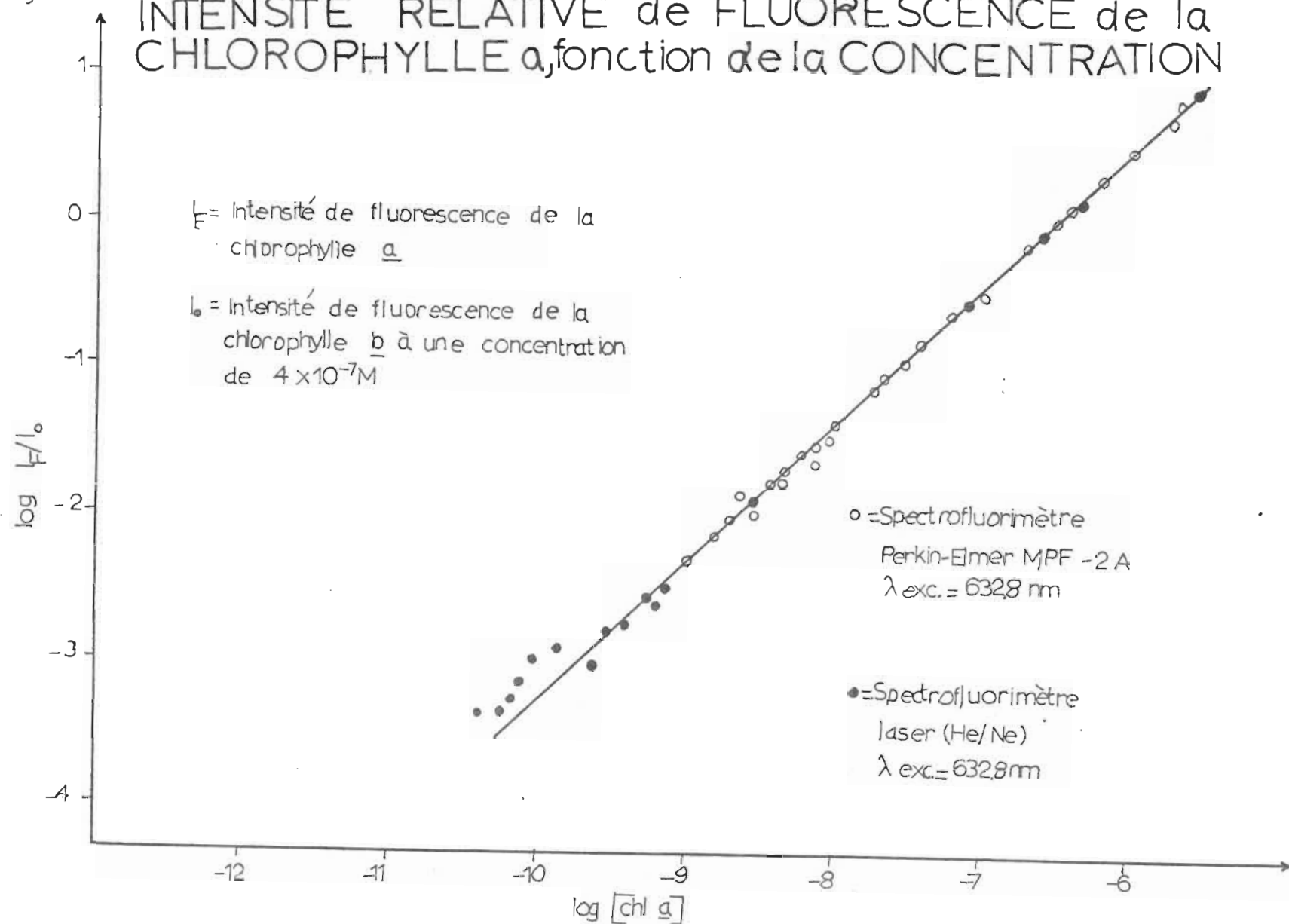
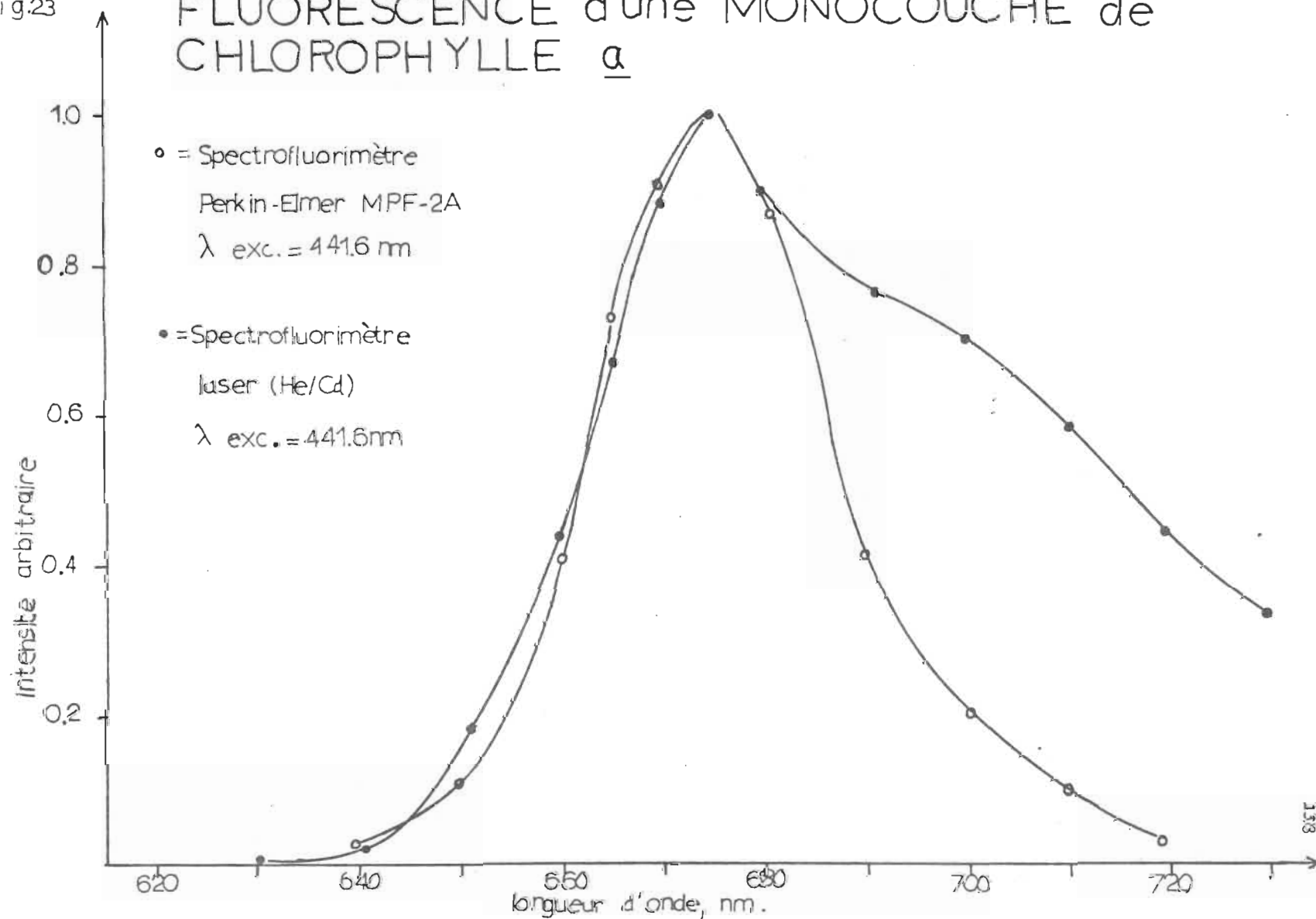


fig.23

FLUORESCENCE d'une MONOCOUCHE de CHLOROPHYLLE a



que nous essayerons de préciser, la fluorescence de la chlorophylle décroît suite au phénomène de "Self-Quenching" qui est en quelque sorte une réabsorption d'une partie de l'énergie lumineuse qui devrait être normalement émise sous forme de fluorescence par ces mêmes molécules.

La figure 24 montre l'importance de l'addition d'une substance telle que le phytol qui, introduite dans la solution de chlorophylle a, et dans la monocouche, éloigne les molécules de pigment empêchant ainsi la réabsorption.

Nous utilisons le spectrofluorimètre Perkin-Elmer puisque ce mécanisme de "Self-Quenching" se produit pour des concentrations de chlorophylle a relativement élevées. Le tableau 12 et la figure 25, nous indiquent que cette zone s'étend dans un domaine de concentrations plus élevées que $7.0-8.0 \times 10^{-6}$ M.

fig.24

FLUORESCENCE d'une MONOCOUCHE de CHLOROPHYLLE a

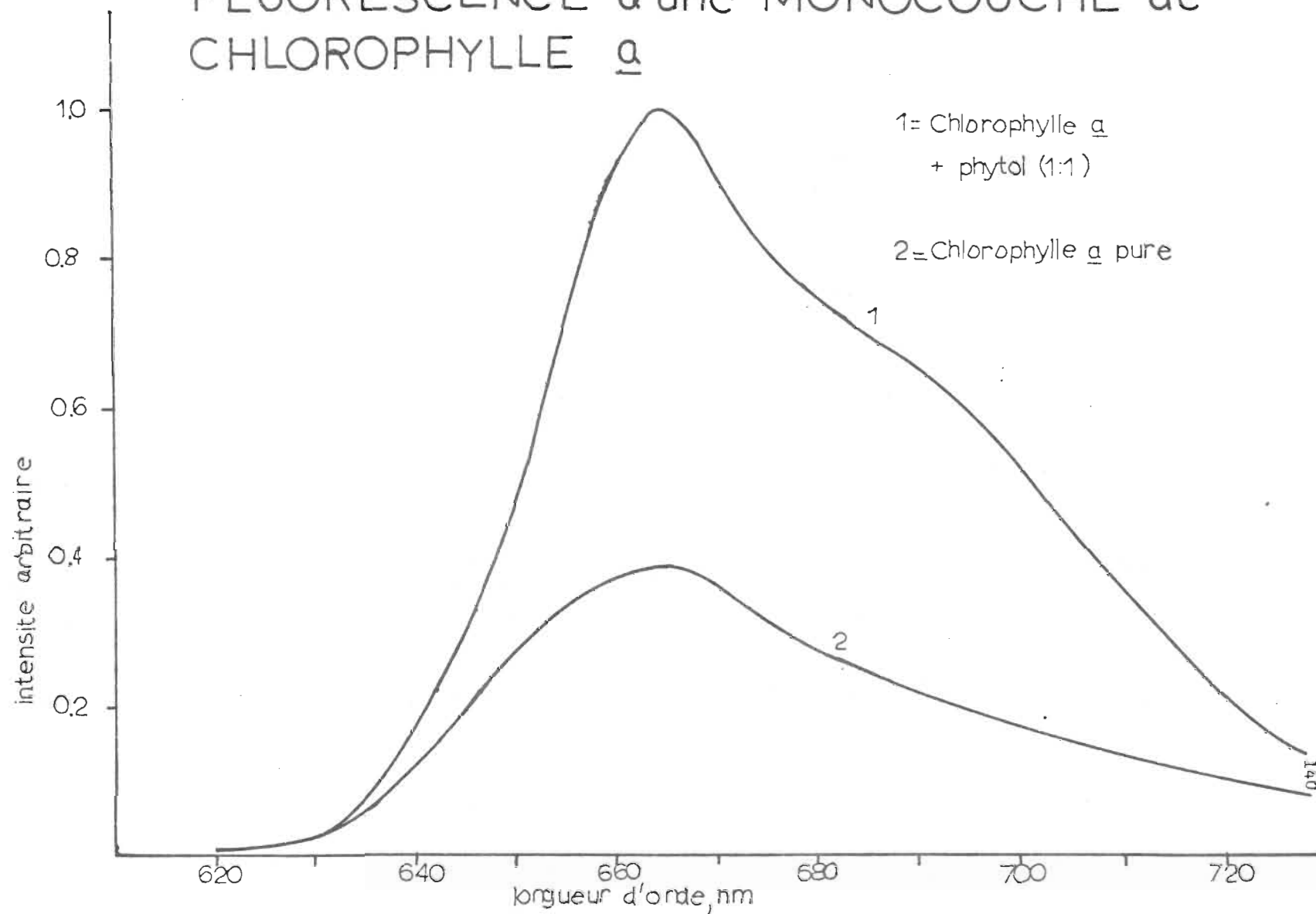
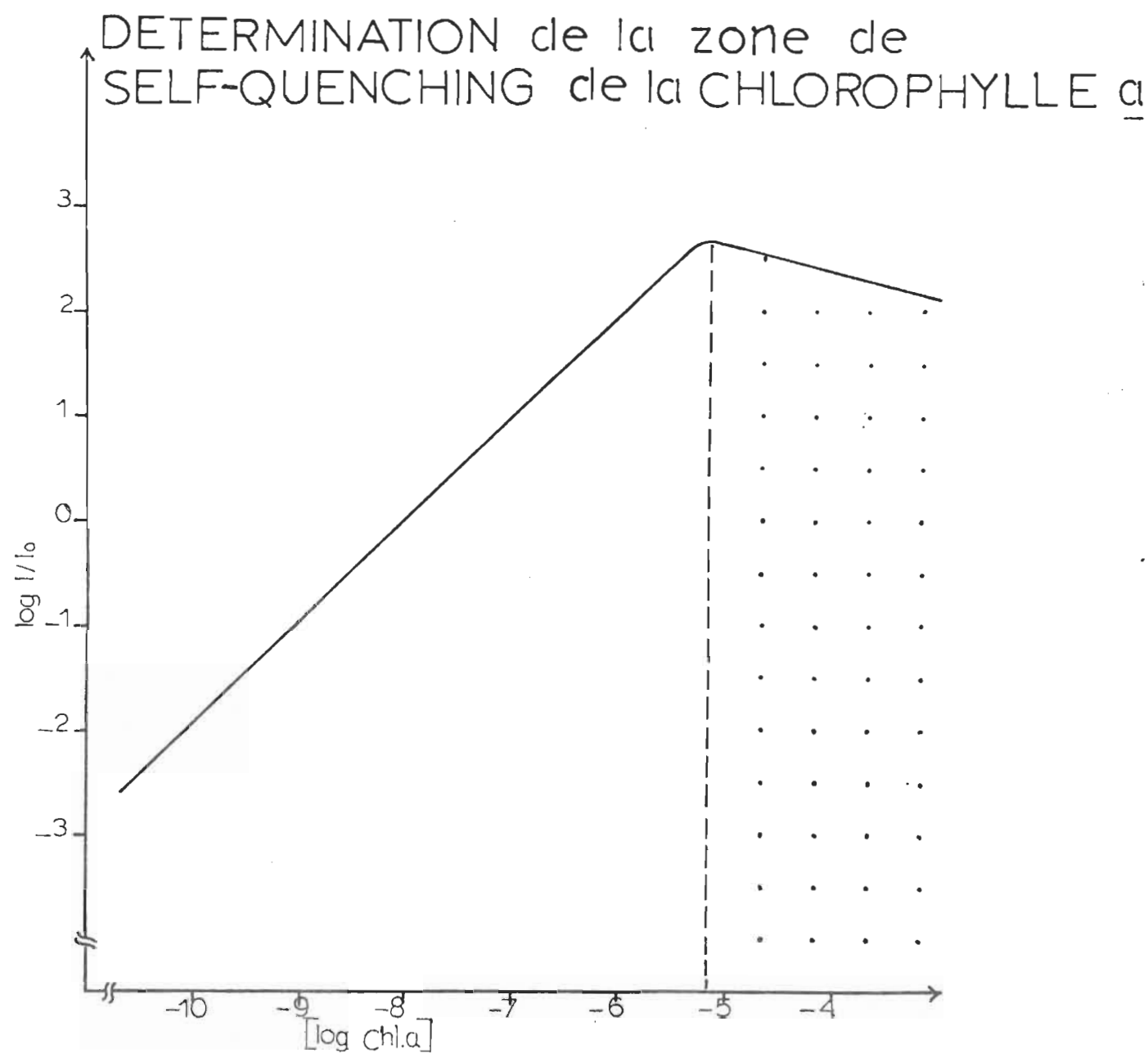


Tableau 12: Détermination de la zone de "self-quenching" de la chlorophylle a
 Intensité relative de fluorescence de la chlorophylle a en fonction de la concentration
 Solution de référence: chlorophylle a : $9.0 \times 10^{-9} M$
 Mesures faites à l'aide du Spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF.2A
 λ excitation: 633 nm

Nature et Normalité de la solution	log. concentration	Absorption à 633 nm		Fluorescence (au maximum)			
		Références	Echantillon	Référence: I_{0cm}	Echantillon: I_{Fcm}	$\frac{I_F}{I_0}$	log. $\frac{I_F}{I_0}$
chlorophylle <u>a</u> (référence) $9.0 \times 10^{-9} M$	- 8.05	trop faible	-	sens 6: 0.9 cm	sens 6: 0.9 cm	1	0
chlorophylle <u>a</u> $1.46 \times 10^{-7} M$	- 6.84	-	2×10^{-3}	sens 6: 0.9 cm	sens 6: 13.1 cm	14.5	1.16
chlorophylle <u>a</u> $1.0 \times 10^{-6} M$	- 6.0	-	1.25×10^{-2}	sens 6: 0.9	sens 4: 8.5 sens 6: 80.0	88.8	1.95
chlorophylle <u>a</u> (référence) $9.0 \times 10^{-9} M$	- 8.05	-	-	sens 6: 0.9	sens 6: 0.9	1	0
chlorophylle <u>a</u> $3.3 \times 10^{-7} M$	- 5.49	-	4.0×10^{-2}	sens 6: 0.9	sens 3: 8.3 sens 6: 224.3	249.2	2.40
chlorophylle <u>a</u> $4.2 \times 10^{-6} M$	- 5.38	-	4.7×10^{-2}	sens 6: 0.9	sens 3: 12.5 sens 6: 337.8	375.3	2.57
chlorophylle <u>a</u> (référence) $9.0 \times 10^{-9} M$	- 8.05	-	-	sens 6: 0.9	sens 6: 0.9	1	0
chlorophylle <u>a</u> $9.4 \times 10^{-8} M$	- 5	-	0.12	sens 6: 0.9	sens 3: 14.6 sens 6: 394.5	438.3	2.64
chlorophylle <u>a</u> $9.0 \times 10^{-5} M$	- 4.05	-	1.2	sens 6: 0.9	sens 3: 8.2 sens 6: 221.6	246.2	2.39

N.B.: Absorption à 633 nm présentée en terme de densité optique d'un échantillon placé dans une cellule de 1.0 cm de parcours optique.

fig.25



3. Comparaison des spectres de fluorescence de la chlorophylle a et des mélanges chlorophylle a / β -carotène.

. Chlorophylle a en solution:

Des expériences précédentes, nous devons retenir un point car il est d'une grande importance pour les présentes expériences, en solution:

Nécessité de maintenir une concentration de chlorophylle a toujours inférieure à 10^{-7} M afin d'éviter le "Self-Quenching" de la fluorescence.

. β -carotène (dans le diéthyléther, ou dans le benzène):

En aucun cas lorsque les solutions de β -carotène ont été préparées le jour même de l'expérience et utilisées immédiatement, il n'a pu être décelé une quelconque fluorescence.

. Mélange chlorophylle a / β -carotène (dans le benzène):

Relativement à la fluorescence, le comportement de la chlorophylle a en solution en présence de concentrations croissantes de β -carotène a été évalué.

Dans de telles conditions, il s'agissait de déterminer si pour une concentration donnée de chlorophylle a ($\approx 10^{-8}$ M) et dans un domaine où le "self-quenching" est exclu, il existe quand même un processus conduisant à une perte de l'intensité de fluorescence.

Les tableaux 13 et 14 permettent de tracer la figure 26.

Elle représente la variation de l'intensité de fluorescence

Tableau 13: Variation de l'intensité de fluorescence de la chlorophylle a en présence de concentrations croissantes de β -carotène.

λ excitation: 632.8 nm - Spectrofluorimètre laser He/Ne.
 chlorophylle a = $3.0 \times 10^{-8}M$ constante
 β -carotène = $3.0 \times 10^{-8}M$ à $3.0 \times 10^{-3}M$

Nature et Normalité de la solution	log [chl. <u>a</u>]	log [β -carotène]	Fluorescence (au maximum) Référence: I_o cm Echantillon I_F cm		$\frac{I_F}{I_o}$	$\log \frac{I_F}{I_o}$
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52		300 NanoA: 2.55	300 NanoA: 2.55	1	0
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3 \times 10^{-8}M$	-7.52	-7.52	300 NanoA: 2.55	300 NanoA: 2.15	0.84	-0.07
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-7}M$	-7.52	-6.52	300 NanoA: 2.55	300 NanoA: 3.0	1.13	+0.05
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52		300 NanoA: 2.55	300 NanoA: 2.55	1	0
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-6}M$	-7.52	-5.52	300 NanoA: 2.55	300 NanoA: 2.4	0.94	-0.026
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-5}M$	-7.52	-4.52	300 NanoA: 2.55	300 NanoA: 2.45	0.96	-0.016
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52		300 NanoA: 2.45	300 NanoA: 2.45	1	0
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-4}M$	-7.52	-3.52	300 NanoA: 2.45	300 NanoA: 1.85	0.755	-0.12
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-3}M$	-7.52	-2.52	300 NanoA: 2.45	300 NanoA: 0.99	0.40	-0.39
β -carotène: $3.0 \times 10^{-3}M$		-2.52	300 NanoA: 2.45	300 NanoA: 0		

Tableau 13: (suite)

Nature et Normalité de la solution	log [chl. a]	log [β-carotène]	Fluorescence (au maximum)		$\frac{I_F}{I_0}$	log $\frac{I_F}{I_0}$
			Référence: I_0 cm	Echantillon: I_F cm		
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 3.25	1	0
chl a: $3.0 \times 10^{-8} M$ / β-carotène: $3.0 \times 10^{-13} M$	-7.52	-12.52	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 3.1	0.95	-0.02
chl a: $3.0 \times 10^{-8} M$ / β-carotène: $3.0 \times 10^{-12} M$	-7.52	-11.52	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 3.25	1	0
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-	300 NanoA: 3.2	300 NanoA: 3.2	1	0
chl a: $3.0 \times 10^{-8} M$ / β-carotène: $3.0 \times 10^{-11} M$	-7.52	-10.52	300 NanoA: 3.2	300 NanoA: 2.75	0.86	-0.06
chl a: $3.0 \times 10^{-8} M$ / β-carotène: $3.0 \times 10^{-10} M$	-7.52	-9.52	300 NanoA: 3.2	300 NanoA: 3.2	1	0
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 3.25	1	0
chl a: $3.0 \times 10^{-8} M$ / β-carotène: $3.0 \times 10^{-9} M$	-7.52	-8.52	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 2.75	0.85	-0.07
chl a: $3.0 \times 10^{-8} M$ / β-carotène: $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-7.52	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 3.15	0.97	-0.012
β-carotène: $3.0 \times 10^{-6} M$	-	-5.52	300 NanoA: 3.25	300 NanoA: 0	-	-

Tableau 14: Variation de l'intensité de fluorescence de la chlorophylle a en présence de concentrations croissantes de β -carotène.

λ excitation: 633 nm - Spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF-2A
 chlorophylle a: $3.0 \times 10^{-8}M$ constante
 β -carotène : $3.0 \times 10^{-8}M$ à $3.0 \times 10^{-3}M$

Nature et normalité de la solution	log [chl a]	log [β -carotène]	Fluorescence (au maximum)		$\frac{I_F}{I_0}$	log $\frac{I_F}{I_0}$
			Référence I_0 cm	Echantillon I_F cm		
chlorophylle a (référence) $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52	-	sens. 6: 2.05	sens. 6: 2.05	1	0
chl a: $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52	-7.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 1.85	0.85	-0.07
chl a: $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-7}M$	-7.52	-6.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 2.15	1.05	+0.02
chlorophylle a (référence) $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52	-	sens. 6: 2.05	sens. 6: 2.05	1	0
chl a: $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-6}M$	-7.52	-5.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 1.9	0.93	-0.03
chl a: $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-5}M$	-7.52	-4.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 1.9	0.93	-0.03
chlorophylle a (référence) $3.0 \times 10^{-8}M$	-7.52	-	sens. 6: 2.05	sens. 6: 2.05	1	0
chl a: $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-4}M$	-7.52	-3.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 1.65	0.8	-0.09
chl a: $3.0 \times 10^{-8}M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-3}M$	-7.52	-2.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 0.8	0.39	-0.41
β -carotène: $3.0 \times 10^{-3}M$	-	-2.52	sens. 6: 2.05	sens. 6: 0		

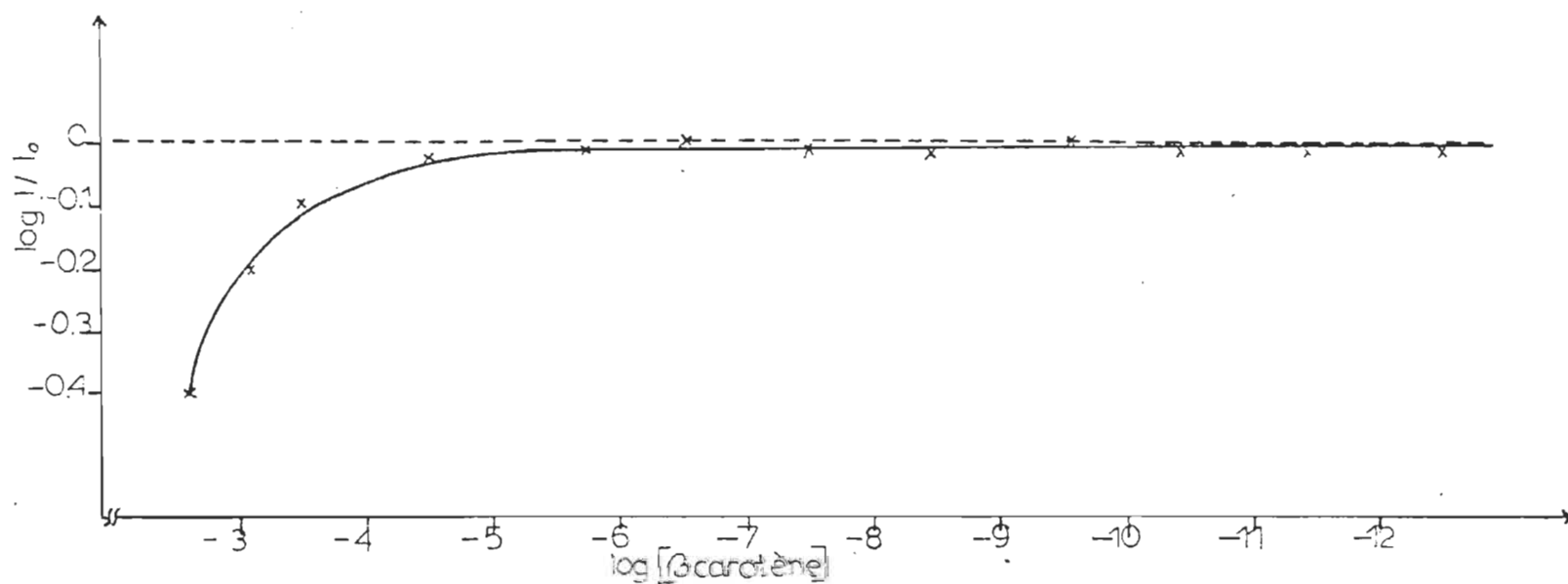
Tableau 14: (suite)

Nature et Normalité de la solution	log [chl <u>a</u>]	log [β -carotène]	Fluorescence (au maximum)		$\frac{I_F}{I_0}$	$\log \frac{I_F}{I_0}$
			Référence: I_0 cm	Echantillon I_F cm		
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52		sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.4	1	0
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8} M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-13} M$	-7.52	-12.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.25	0.94	-0.028
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8} M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-12} M$	-7.52	-11.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.2	0.92	-0.037
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.4	1	0
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8} M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-11} M$	-7.52	-10.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.15	0.895	-0.047
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8} M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-10} M$	-7.52	-9.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.4	1	0
chlorophylle <u>a</u> (référence) $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.4	1	0
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8} M$ / β -carotène: $3 \times 10^{-9} M$	-7.52	-8.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.0	0.83	-0.07
chl <u>a</u> : $3.0 \times 10^{-8} M$ / β -carotène: $3.0 \times 10^{-8} M$	-7.52	-7.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 2.3	0.96	-0.018
β -carotène: $3.0 \times 10^{-6} M$	-	-5.52	sens. 6: 2.4	sens. 6: 0	-	-

fig 26

VARIATION de l'intensité de FLUORESCENCE
d'une solution de CHLOROPHYLLE a en fonction
de la concentration de β .CAROTÈNE

Solvant: Benzène
Chlorophylle a : 3×10^{-8} M



de la chlorophylle a exposé à une radiation lumineuse de longueur d'onde

$$\lambda = 632.8 \text{ nm (ou } 633 \text{ nm, suivant l'appareil utilisé)}$$

Quelques réflexions peuvent déjà être émises concernant l'interprétation du graphique:

- La longueur d'onde d'excitation du mélange:

chlorophylle a / β -carotène étant 632.8 nm, c'est dire que dans cette région du spectre le β -carotène ne contribue en rien à l'absorption de la lumière excitatrice (du moins sous forme de monomère).

- Il existe une perte croissante de la fluorescence de la chlorophylle a lorsque la concentration de β -carotène atteint $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$.

De quelle manière le β -carotène participe-t-il à ce mécanisme?

Existe-t-il un transfert d'énergie de la chlorophylle a vers le β -carotène?

Quel type de transfert?

Est-ce un phénomène de quenching de la chlorophylle a à l'état singulet par le β -carotène?

La figure ne nous permet pas de le dire.

C'est en essayant d'appliquer la théorie de Stern-Volmer à cette cinétique que nous pourrions prévoir si un transfert d'énergie a lieu entre les pigments photosynthétiques du mélange (167).

IV.3 Cinétique Stern-Volmer appliquée au mélange chlorophylle a / β -carotène, en solution

1. Rappel de la théorie:

La cinétique "Stern-Volmer" s'applique à un système photo-physique où deux molécules d'espèces différentes sont mises en présence. Elle étudie le processus de désactivation radiative de l'état excité d'une espèce D par addition de l'autre: A, dans un intervalle de concentrations restreint.

Soit D la molécule initiale capable d'émettre de la luminescence (chlorophylle a par exemple),

Sous excitation continue: $[D^*]$ reste constante soit

$$\frac{dD^*}{dt} = 0$$

Si aucun processus de désactivation de D^* n'intervient pendant l'intervalle de temps τ^0 (temps de vie de l'état excité de D), D^* émettra un photon et sera désactivée.

Si D^* est l'état excité le plus bas des niveaux singulets, c'est-à-dire 0S_1 , la vitesse de disparition de D^* peut s'écrire:

$$\frac{dS_1}{dt} = k_f [S_1] + k_{ST} [S_1] + k_S [S_1] +$$

$$\sum_i k_i [S_1] [Q_i] + \sum_j k_j [S_1]$$

où k_f = constante de vitesse pour la fluorescence

k_{ST} = constante de vitesse pour $S_1 \rightarrow T_1$

k_S = constante de vitesse pour $S_1 \rightarrow S_0$

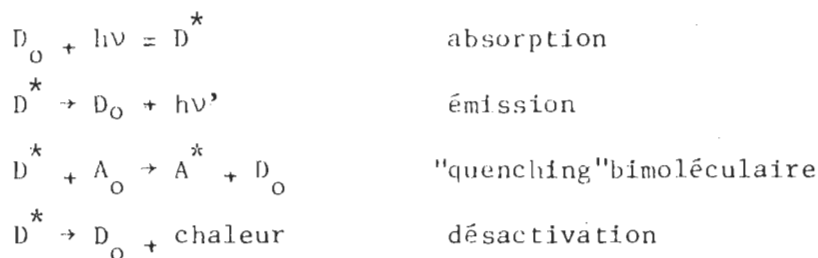
k_i = constante de vitesse du quenching bimoléculaire

$$\begin{aligned}
 k_j &= \text{constante de vitesse de "self-quenching"} \\
 [S_1] &= \text{concentration de } S_1 \text{ à l'équilibre} \\
 [Q_1] &= \text{concentration du "quencher"}
 \end{aligned}$$

Nous voyons que dans cette équation interviennent deux types de quenching: - le "quenching" bimoléculaire
- le "self-quenching"

Comme nous devons exclure le "self-quenching" puisque les expériences ont lieu avec de faibles concentration de chlorophylle a ($\approx 10^{-8} M$), la seule désactivation de l'état de la molécule D considérée doit résulter de l'interaction des molécules excitées avec les composants du système.

Considérons le processus de "quenching" d'une molécule excitée D^* , par addition d'une autre molécule A (β -carotène par exemple)



avec les vitesses respectives pour chacune des réactions:

$$\begin{aligned}
 I_a \text{ (einsteins/l. sec)} &= \text{vitesse d'absorption de la lumière} \\
 k_1 [D^*] & \quad \quad \quad (\text{émission}) \\
 k_2 [D^*] [A] & \quad \quad \quad (\text{"quenching" bimoléculaire}) \\
 k_3 [D^*] & \quad \quad \quad (\text{désactivation})
 \end{aligned}$$

Remarques: I_a = vitesse de formation de D^*
 D^* = état excité singulet ou triplet

Sous illumination continue, comme c'est le cas dans nos expériences, et en absence de réactions irréversibles:

$$\frac{d [D^*]}{dt} = I_a - (k_1 + k_2 [A] + k_3) [D^*]$$

A l'équilibre: $I_a = (k_1 + k_2 [A] + k_3) [D^*]$

Appelons ϕ_0 , le rendement quantique d'émission à partir de D^* et en absence de A

$$\phi_0 = \frac{k_1 [D^*]}{I_a} = \frac{k_1}{k_1 + k_3}$$

Lorsque l'on ajoute A, à une concentration, le rendement quantique d'émission à partir de D^* devient ϕ_A

$$\text{Soit } \phi_A = \frac{k_1 [D^*]}{I_a} = \frac{k_1}{k_1 + k_3 + k_2 [A]}$$

Ceci nous permet d'établir:

$$\frac{\phi_0}{\phi_A} = \frac{k_1 + k_3 + k_2 \cdot [A]}{k_1 + k_3}$$

ou $\frac{\phi_0}{\phi_A} = 1 + k_2 \cdot \tau [A]$

avec $\tau = \frac{1}{k_1 + k_3}$ correspondant au temps de vie mesuré de D^* en absence de A.

En posant $\frac{\phi_0}{\phi_A} = K \cdot [A]$ où $K = \text{pente de la droite} = k_2 \cdot \tau$,
 comme τ peut être évalué, k_2 : constante de
 vitesse de désactivation de D^* par quenching
 bimoléculaire (ou transfert d'énergie) peut
 être déterminée facilement.

2. Résultats expérimentaux

En utilisant nos résultats, nous avons calculé $\frac{I_0}{I_F}$ pour la
 chlorophylle a, en fonction de quantités croissantes de
 β -carotène.

Le tableau 15 et la figure 27 nous montrent que pour des
 concentrations de β -carotène comprises entre $1.0 \times 10^{-6} M$
 et $5.0 \times 10^{-4} M$ le rapport $\frac{I_0}{I_F}$ en fonction de [β -carotène]
 donne une droite de pente K .

$$K = 3.3 \times 10^2 = k_2 \cdot \tau$$

N.B.: Au chapitre 1.4.3, τ = temps de vie de la chlorophylle a
 en absence de quencher $\approx 5 \times 10^{-9}$ sec.

(Temps de vie radiatif: 15×10^{-9} sec.)

(Temps de vie fluorescence: 5×10^{-9} sec.),

Nous conduit à une valeur de k_2 = constante de quenching
de la chlorophylle a par le β -carotène $\approx 6.6 \times 10^8 \text{ mole}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$

Pour des concentrations de β -carotène supérieures à $5.0 \times 10^{-4} M$
 un phénomène différent d'un transfert d'énergie chlorophylle a \rightarrow
 β -carotène se produit. Nous ne l'interpréterons pas ici.

Tableau 15: Cinétique Stern-Volmer appliquée au mélange
"chlorophylle a/β-carotène" exposé à une
 lumière excitatrice de longueur d'onde
 632.8 nm (ou 633 nm)
 concentration de chlorophylle a constante: $3.0 \times 10^{-8} \text{ M}$

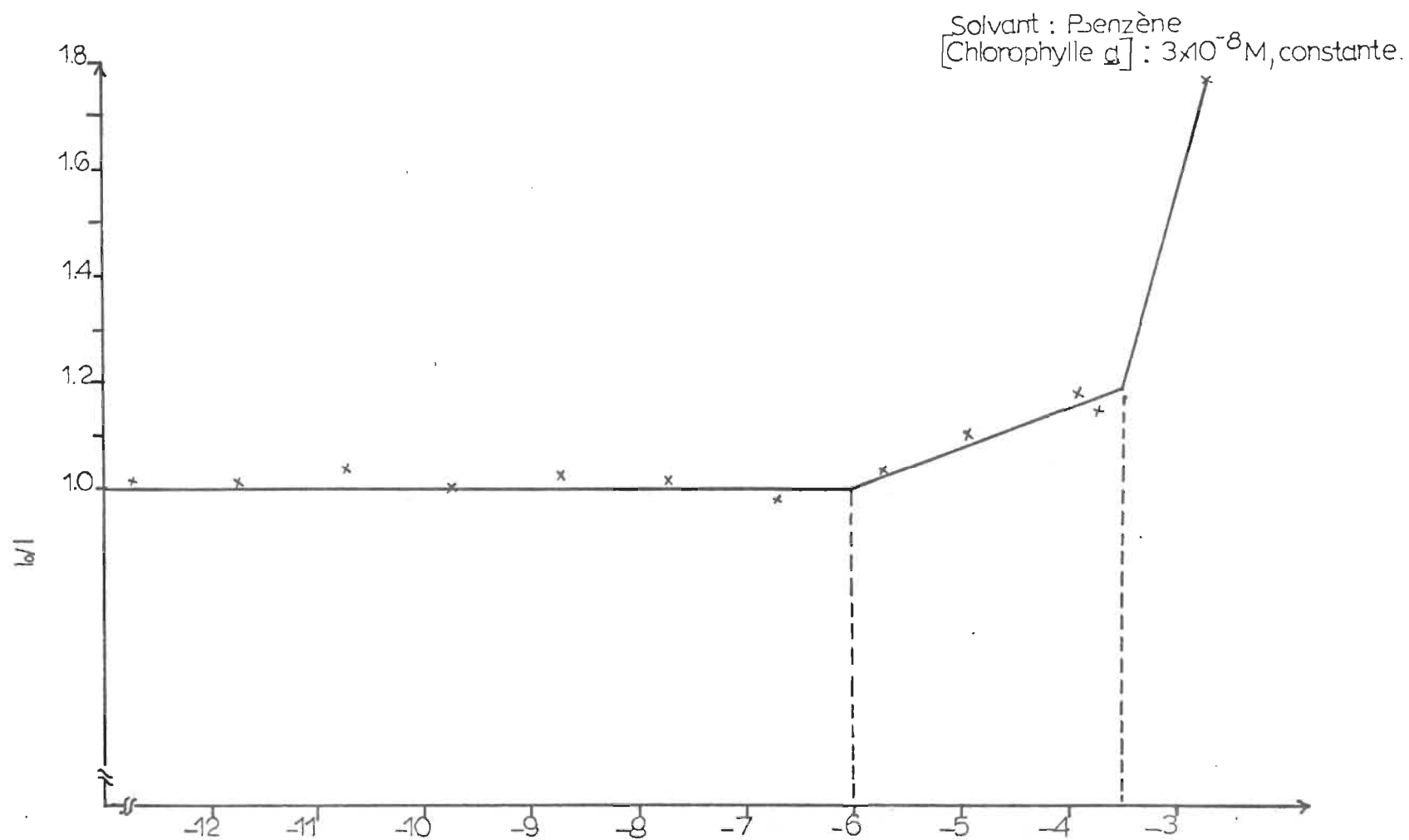
$[\beta\text{-carotène}]$	I_0 cm	I cm	$\frac{I_0}{I}$
$3.0 \times 10^{-13} \text{ M}$	3.25	3.1	1.06
$3.0 \times 10^{-12} \text{ M}$	3.25	3.25	1.04
$3.0 \times 10^{-11} \text{ M}$	3.2	2.75	1.14
$3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$	3.2	3.2	1.0
$3.0 \times 10^{-9} \text{ M}$	3.25	2.75	1.19
$3.0 \times 10^{-8} \text{ M}$	3.25	3.15	1.04
$3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$	2.55	3.0	0.92
$3.0 \times 10^{-6} \text{ M}$	2.55	2.4	1.07
$3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	2.55	2.45	1.06
$3.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	2.45	1.85	1.28
$3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	2.45	0.99	2.53

. I_0 = intensité de fluorescence
 de la chlorophylle a en
 absence de β-carotène.

. I = intensité de fluorescence
 de la chlorophylle a en
 présence de β-carotène.

fig.27

CINETIQUE STERN-VOLMER pour des mélanges CHLOROPHYLLE α - β .CAROTENE



CHAPITRE V

DEPOLARISATION DE LA FLUORESCENCE

CHAPITRE V. DEPOLARISATION DE LA FLUORESCENCE

1. Hypothèses actuelles sur l'orientation de la chlorophylle a dans le système photosynthétique

1. "In vivo"

Le problème de l'orientation de la chlorophylle a "in vivo", dans les lamelles intergranaires et les thylakoïdes n'a pas encore été résolu clairement. Même si la majorité des chercheurs reconnaît que la molécule doit être orientée préférentiellement dans la structure en "couches d'un disque granaire (schéma: 3) le degré d'orientation et l'angle que fait l'anneau porphyrine avec la surface du thylakoïde restent encore imprécis.

Certains auteurs considèrent que les molécules de pigments sont faiblement orientées (167 à 170) par contre d'autres pensent que la chlorophylle occupe une surface bien déterminée, respectant un "angle magique". (73, 171 à 174)

2. "In vitro"

Des études, en monocouches, tendent aussi à apporter quelques précisions concernant le sujet (175 à 176). Dans ce cas également une certaine orientation de la chlorophylle est signalée.

Plusieurs moyens sont actuellement employés, notamment:

- quantification du potentiel électrique généré à travers "la membrane" au cours des illuminations

- polarisation de l'absorption lumineuse
- dépolarisation de la fluorescence
- dichroïsme magnétique

pour n'en citer que quelques uns.

2. Résultats expérimentaux

A l'aide du polariseur annexé sur spectrofluorimètre laser He/Ne nous avons essayé de mettre en évidence l'orientation possible de la chlorophylle a en monocouches.

Plusieurs séries d'expériences ont été effectuées à l'aide de lamelles de quartz préalablement recouvertes d'arachidate de cadmium pour assurer une meilleure déposition des pigments chlorophylliens.

Comme dans les manipulations précédentes, seules les lamelles dont les rapports de déposition étaient très bons(soit supérieurs à 0.9) sont utilisées.

Une seule monocouche de chlorophylle a recouvre chacune des faces, et dans tous les cas nous avons obtenu des résultats identiques.

- l'intensité de fluorescence de la chlorophylle a varie suivant l'angle de polarisation de la lumière incidente qui frappe l'échantillon
- cette variation est régulière et donne une courbe sinusoïdale lorsque l'angle de polarisation varie de 0° à 360° .

Afin d'éliminer toute cause d'erreur, due par exemple à la perte naturelle de la fluorescence de la chlorophylle a lorsqu'elle est irradiée pendant un certain temps avec une source continue de lumière, les mesures de l'intensité de fluorescence ont été prises

- soit immédiatement, dès l'ouverture de l'obturateur
au maximum de fluorescence
- soit dans la partie linéaire horizontale de la courbe
de décroissance de la fluorescence
de la chlorophylle a en fonction
du temps (figure 28).

Dans le premier cas chaque lamelle n'était utilisée que pour une ou deux mesures:

- la détermination de I_0 = intensité de fluorescence de la
chlorophylle a pour un angle de
polarisation égal à 0^0 (figure 29)
- la détermination de I = intensité de fluorescence de la
chlorophylle a pour un angle de
polarisation donné.

Dans le deuxième cas, une vérification de l'existence de la fluorescence est faite après l'obtention du spectre de décroissance de la luminescence en fonction du temps.

fig28

DECROISSANCE de la FLUORESCENCE
d'une lamelle de CHLOROPHYLLE a
en fonction du temps

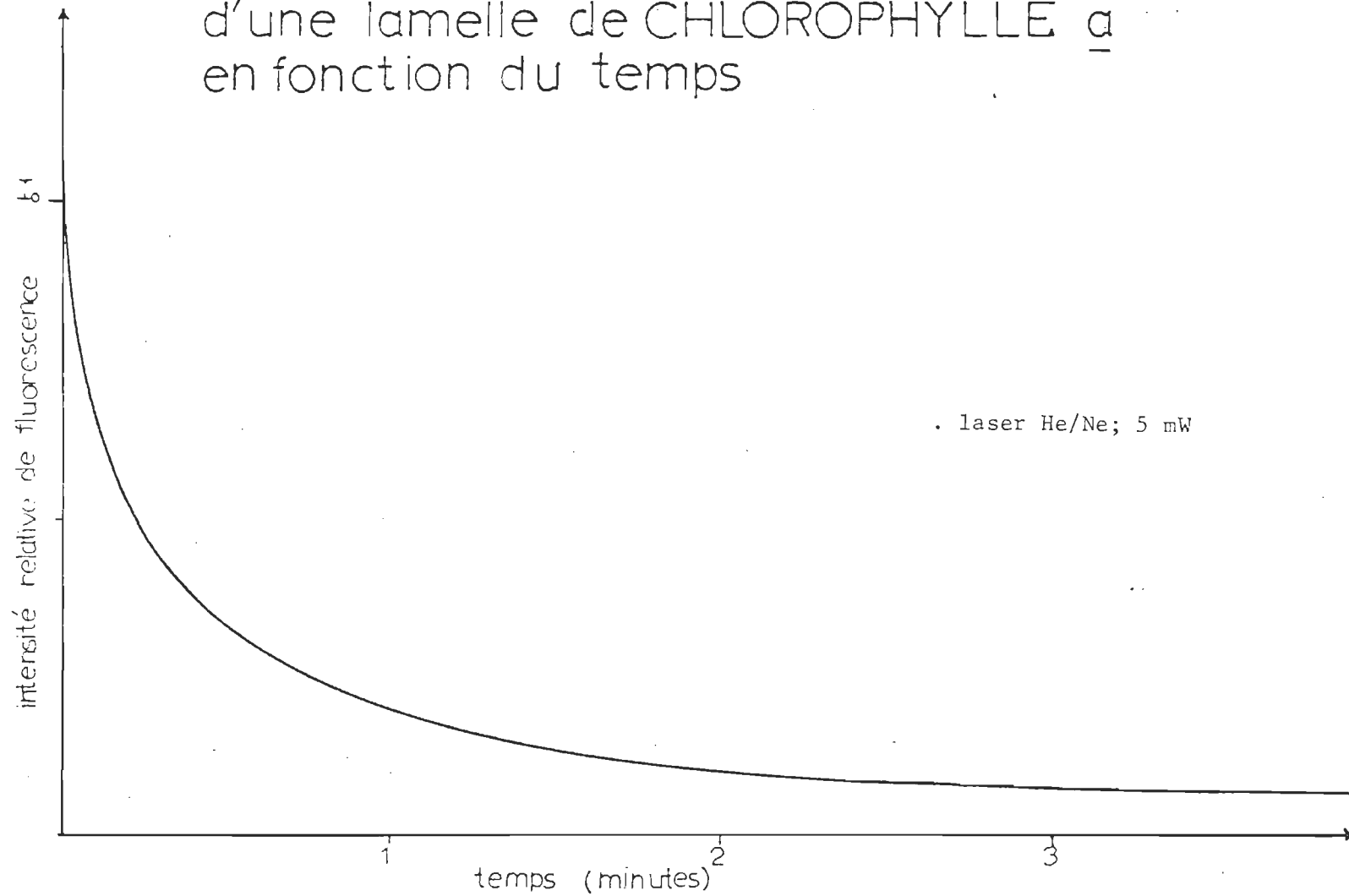
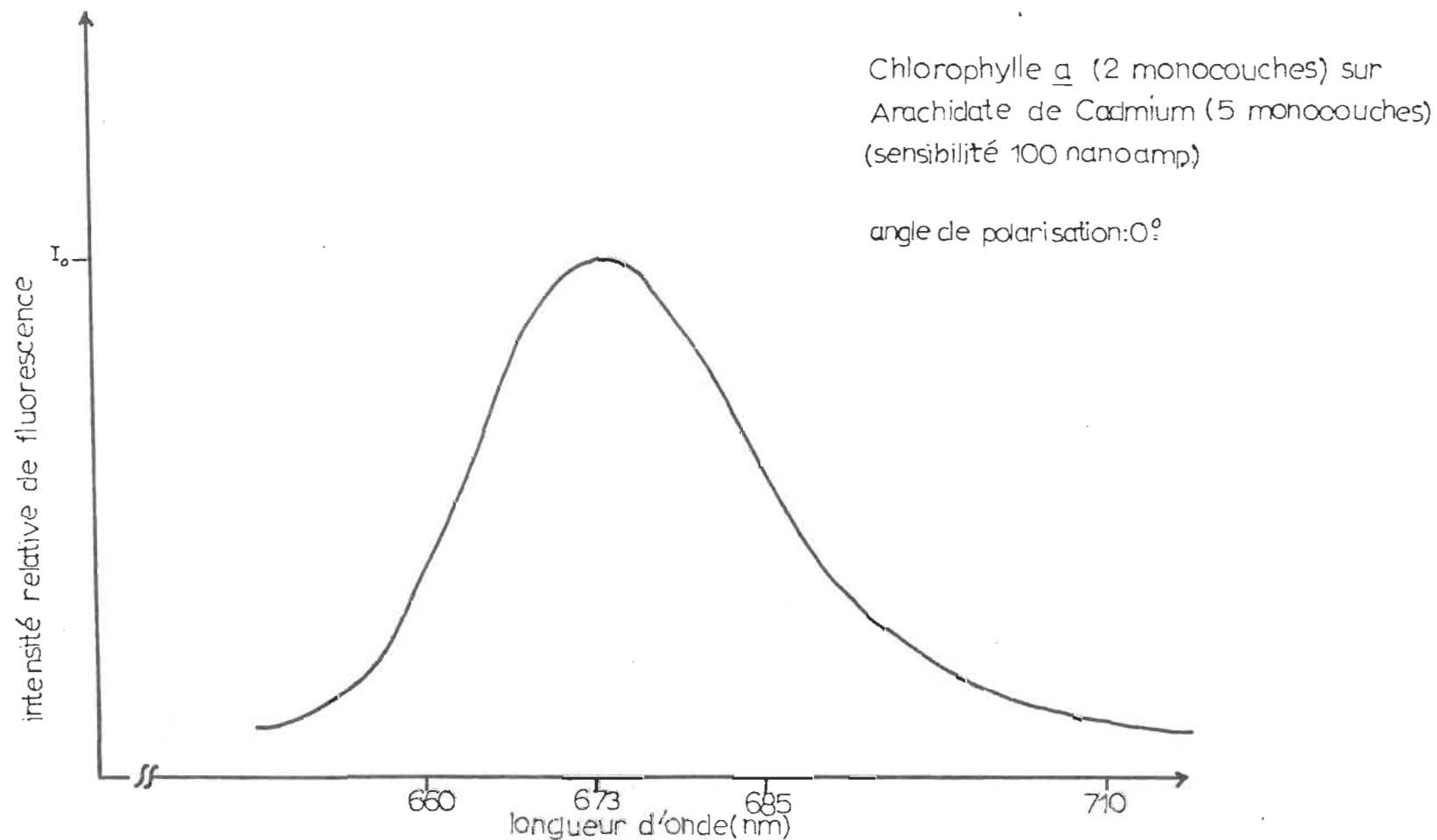


fig.29 SPECTRE DE FLUORESCENCE de la
CHLOROPHYLLE a à l'état de MONOCOUCHE
 λ excitation; 632.8 nm



Des tableaux tels que celui de la page 163 (tableau 16) nous ont permis de tracer la figure 30.

Elle indique clairement qu'il existe une orientation de la chlorophylle a en monocouches qui ne peut être imputée à la structure de la lamelle de quartz "nue" ou recouverte d'acide arachidique. En effet, des spectres de fluorescence ont été pris en fonction de l'angle de polarisation de la lumière incidente, pour ces deux derniers cas:

Aucune fluorescence ni aucune variation de la ligne de base n'ont été observées.

De plus, des films de chlorophylle a ont été également étudiés: Leurs spectres de fluorescence ne montraient aucune variation de l'intensité lumineuse émise par eux en fonction de l'angle de polarisation. (figure 31)

Les expériences que nous avons réalisées jusqu'à présent ont été faites avec des lamelles orientées comme indiqué dans le schéma 11.

Tableau 16: Dépolarisation de la fluorescence de la chlorophylle a en monocouche.

Spectrofluorimètre laser He/Ne: λ excitation 632.8 nm.

Lamelle no. 3: Caractéristiques: Rapport de déposition
de l'acide arachidique: 0.94

Rapport de déposition
de la chlorophylle a: 1.04

Degré de rotation du polariseur	I_0 cm	I cm	$\frac{I}{I_0}$
0	17.3	17.3	1
30	17.15	15.8	0.92
60	17.0	14.25	0.84
90	16.75	13.4	0.8
120	16.5	14.25	0.86
150	16.35	15.8	0.97
180	16.2	16.2	1.0
210	16	15.7	0.98
240	15.85	13.6	0.86
270	15.65	13.3	0.84
300	15.49	14.2	0.92
330	15.37	15.25	0.99
360	15.25	16.1	1.05
0	15.1	15.1	1.0

I_0 cm = intensité de fluorescence de la lamelle à 0°

I cm = intensité de fluorescence de la lamelle à un angle déterminé

fig.30 VARIATION de l'intensité de FLUORESCENCE de MONOCOUCHEs de CHLOROPHYLLE a en fonction de l'angle de POLARISATION de la lumière incidente

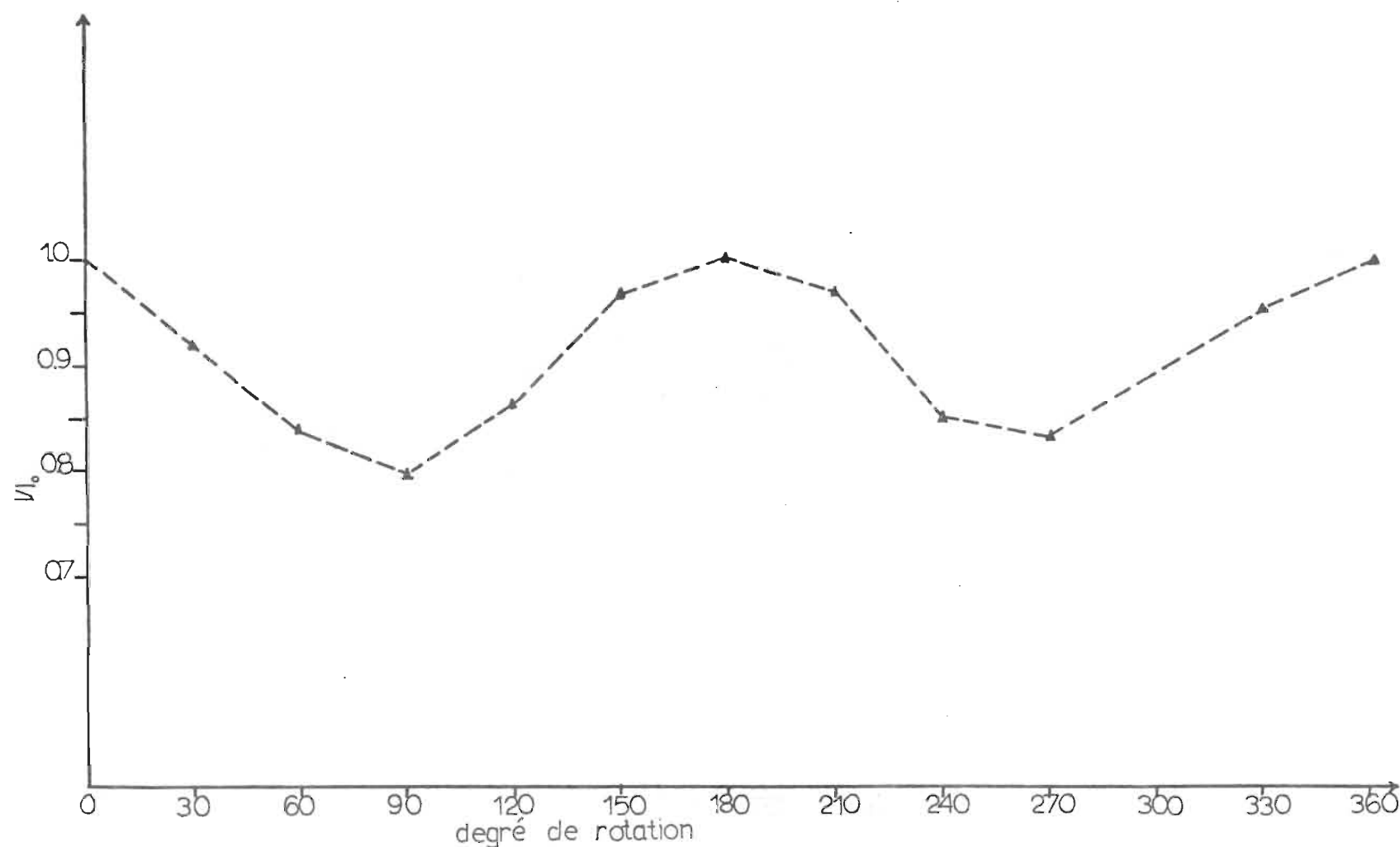
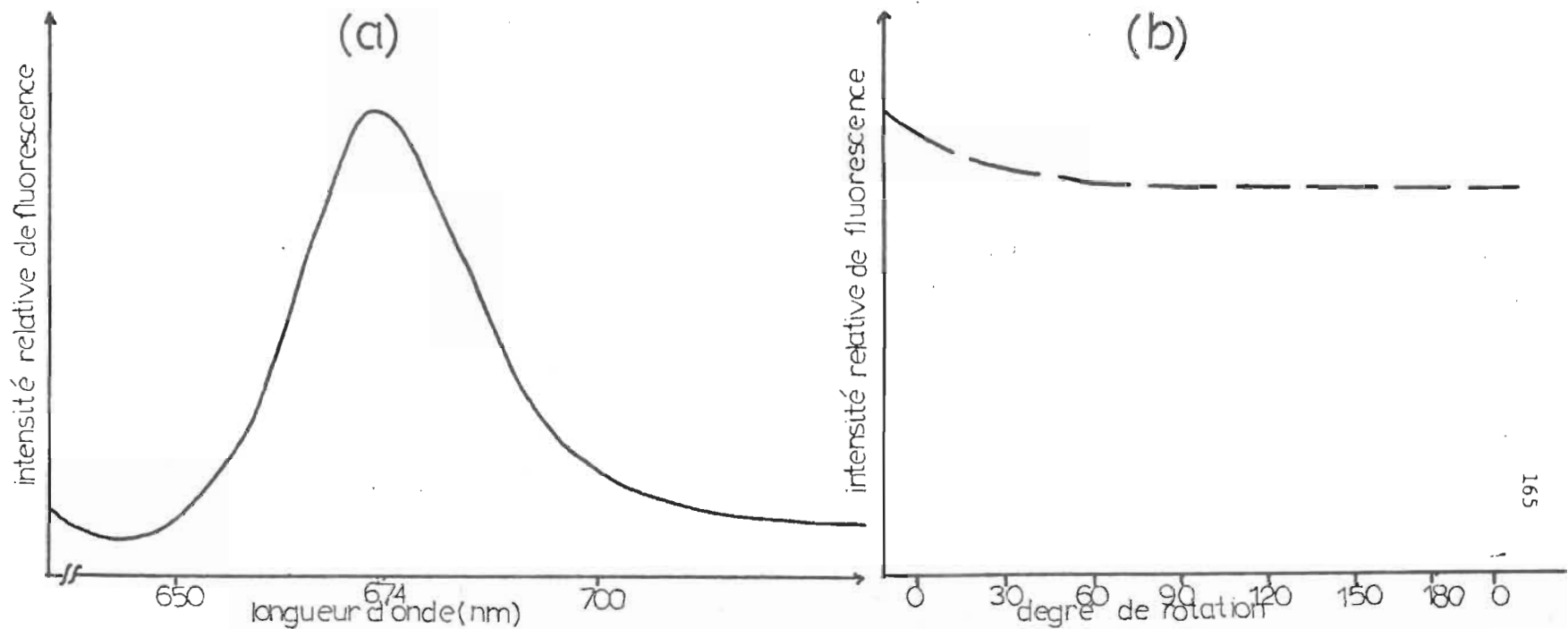


fig.31

FLUORESCENCE de la CHLOROPHYLLE a à l'état solide : FILM ; λ excitation : 632.8nm

- (a) spectre de fluorescence du film Chlorophylle a .
(b) variation de la fluorescence en fonction de l'angle
de polarisation de la lumière incidente. λ émis : 674 nm
(sensibilité : 100 nanoamp, 50 mv)



CHAPITRE VI

CONCLUSION

VI - CONCLUSION

La présente étude nous amène à établir les conclusions suivantes concernant l'obscur problème du transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques:

- Un transfert d'énergie non radiatif, par résonance induite, de la chlorophylle a vers le β -carotène est possible.

Dans les conditions: λ excitation = 632.8 nm

$$[\text{chlorophylle } \underline{a}] < 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$10 \times 10^{-6} \text{ M} < [\beta\text{-carotène}] < 5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$$

la constante de quenching de la chlorophylle a par le β -carotène $\approx 6.6 \times 10^8 \text{ mole}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$

Lorsque la concentration du β -carotène est supérieure à $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, un mécanisme différent de celui-ci a lieu.

- Dans le thylakoïde, il semble très probable que les molécules de chlorophylle a soient orientées préférentiellement comme le montre le comportement de ce pigment en monocouche.

D'autre part:

- La zone de "self-quenching" de la chlorophylle a s'étend dans des domaines où sa concentration est supérieure à $8.0 \times 10^{-6} \text{ M}$.
- A partir du mélange "1 β -carotène: 4 acide arachidique", établi comme étant idéal,
La courbe de pression de surface du β -carotène s'avère

identique à celle obtenu par Leblanc, R.M., Orger B.H. (164).

Nous avons également confirmé que:

- Le β -carotène n'est pas un pigment fluorescent à la température de la pièce.

et nous mettons en évidence qu'

- Il fait partie du système "trappe" du thylakoïde où est retenue l'énergie nécessaire au déclenchement de la photosynthèse.

Nous avons vu que le β -carotène joue le rôle d'un accepteur dans la chaîne de transfert d'énergie entre les pigments photosynthétiques, or son spectre d'absorption montre qu'il n'absorbe pas dans le rouge.

Faut-il supposer, qu'après excitation par de la lumière à 633 nm, un certain pourcentage de chlorophylle a amené dans un état triplet, transfère une partie de l'énergie acquise au β -carotène lui-même dans un état métastable?

Le schéma (4), à la page 56, montre qu'une telle transition $\Pi^* - \Pi^*$ est vraisemblable.

Une autre hypothèse peut être envisagée:

La chlorophylle a, à l'état de monomère, initialement "isolée" dans le thylakoïde, aurait tendance à se réorienter de manière à assurer une forme de couplage avec le β -carotène, forme sous laquelle le caroténoïde joue le rôle d'accepteur.

Dans des études ultérieures, qui feront l'objet d'une recherche pour l'obtention du diplôme de Doctorat, nous essayerons de prouver qu'

- Un transfert d'énergie β -carotène \rightarrow chlorophylle a existe également.
- Il est prépondérant comparé à celui chlorophylle a \rightarrow β -carotène.
- En captant l'énergie lumineuse, dans la région "bleu" du spectre, le caroténoïde prévient la photooxydation de la chlorophylle a.

Nous préciserons:

- La vitesse de transfert d'énergie entre la chlorophylle a et le β -carotène.
- La propriété éventuelle qu'a le β -carotène de "quencher" l'état singulet de la chlorophylle a.
- L'orientation de la chlorophylle a en monocouche mixte (chlorophylle / β -carotène) après absorption de l'énergie lumineuse émise par le spectrofluorimètre He/Cd (λ excitation: 441.6 nm).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Heitz, E., *Planta* 26, 134 (1936).
- 2) Strugger, S., *Ber. deut. botan. Ges.* 64, 69 (1951).
- 3) Frey Wyssling, A., Steinmann, E. *Vierte Jahresschrift. Nat. Zurich* 98, 20 (1953).
- 4) Steinmann, E., *Exp. Cell. Res.* 3, 367 (1952).
- 5) Mhlhenthaler, K., The ultrastructure of the plactic lamellae.
 Dans "Biochemistry of Chloroplasts". F.W. Goodwin Ed.,
 Academic Press London, 1, 49 (1966).
- 6) Kreutz, W., dans "Progress in Photosynthesis research".
 Metzner H. Ed., Laupp - Tllbingen, 1, 91 (1969).
- 7) Mueller, P., Tien, H.T., Wescott, W.C., *Circulation*, 26, 1167 (1962).
- 8) Van N.T., Tien, H.T., *J. Phys. Chem.* 74, 3559 (1970).
- 9) Wessels, J.S.C., Van Koten Hertogs, M., *Philips technical Review* 27,
 241 (1966).
- 10) De Costa, S.M., Froines, J.R., Harris, J.M., Leblanc, R.M.,
 Orger, B.H., Porter, G., *Proc. Roy. Soc. London A* 326, 503 (1973).
- 11) Sjoerdsma, W., *Nature* 138, 405 (1936).
- 12) Alexander, A.E., *J. Chem. Soc.* 777 (1939).
- 13) Langmuir, I., Schaeffer, V.I., Sobotka, H., *J. Amer. Chem. Soc.* 59,
 1751 (1937).
- 14) Jacobs, E., Rabinovitch, E., *Arch. Bioch. Biophys.* 72, 495 (1957).
- 15) Trurnit, H.J., Colmano, G., *Biochim. Biophys. Acta* 31, 434.
- 16) Colmano, G., *Biochim. Biophys. Acta* 47, 454 (1961).

- 17) Colmano, G., Nature 193, 1287 (1962).
- 18) Gaines, G.L., Insoluble monolayers at liquid - gaz interface.
John Wiley and Sons. New York (1966).
- 19) Gaines, G.L., J. Phys. Chem. 63, 1322 (1959).
- 20) Gaines, G.L., J. Coll. and interface Sc. 28, 334 (1968).
- 21) Litvin, F.F., Gulyaev, B.A., Dokl. Akad. Nauk SSSR 158, 460 (1964).
- 22) Litvin, F.F., Gulyaev, B.A., Sineshchekov, V.A., Dokl. Akad. Nauk
SSSR 162, 1184, (1965).
- 23) Sineshchekov, V.A., Litvin, F.F., Das, M.,
Photochem. Photobiol. 15, 187 (1972).
- 24) Brody, S.S., Science, 128, 838 (1958).
- 25) Brody, S.S., Aghion, J., Broyde, S., Biochemistry 8, 3120 (1969).
- 26) Porter, G., Proc. Roy. Soc. A 200, 284 (1950).
- 27) Porter, G., Amster, R.L. , Proc. Roy. Soc. A, 296, 38 (1968).
- 28) Noyes, W.A., Hammond, G.S., Pitts, J.N. Ed. Advances in Photochemistry.
Interscience, New York (1963-1964).
- 29) Krasnovskii, A.A., Ann. Review Plant Phys. 11, 363 (1960).
- 30) Rideal, E.K., Mitchell, J.S., Proc. Roy. Soc. London A 159, 206 (1937).
- 31) Alexander, A.E., J. Chem. Soc. 1813 (1937).
- 32) Bellamy, W.D., Gaines, G.L., Tweet, A.G., J. Chem. Phys. 39,
2528 (1963).
- 33) Tweet, A.G., Gaines, G.L., Bellamy, W.D., J. Chem. Phys. 40,
2596 (1964).
- 34) Tweet, A.G., Gaines, G.L., Bellamy, W.D., J. Chem. Phys. 41,
1008, 2068 (1964).

- 35) Rosoff, M., Arow, C., J. Phys. Chem. 69, 21 (1965).
- 36) Förster, Th., Transfer mechanism of electronic excitation.
Disc. Faraday Soc. 27, 7 (1969).
- 37) Förster, Th., Transfer mechanism of electronic excitation energy.
Radiation Research Suppl. 2, 326 (1960).
- 38) Förster, Th., Excitation transfer dans "Comparative effects of
radiation". Burton, M., Smith, K., Magee Eds.,
John Wiley and Sons, New York. 300 (1960).
- 39) Förster, Th., "Modern quantum Chemistry." Istambul lectures.
Oktay Sinanoglu Ed., Academic Press London. 93 (1965).
- 40) Förster, Th., "Mechanisms of Energy transfer" dans
"Energetics and Mechanisms in Radiation Biology",
G.O. Phillips Ed., Academic Press. 183 (1965).
- 41) Katz, E., Photosynthesis in Plants. Iowa State College Press.
Ames, Iowa. 287 (1949).
- 42) Rosenberg, B., J. Chem. Phys. 29, 1108 (1958).
- 43) Rosenberg, B., Disc. Faraday Soc. 27, 254 (1959).
- 44) Rosenberg, B. and Camiscoli, J.F., J. Chem. Phys. 35, 982 (1961).
- 45) Komissarov, G., Soviet Science Review, Sept. 1971, 285 (1971).
- 46) Nelson, R.C., J. Chem. Phys. 27, 864 (1957).
- 47) Arnold, W.J., Sherwood, H., Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 105 (1957).
- 48) Cherry, R.J., Chapman, D., Molec. Cryst. 3, 251 (1967).
- 49) Olson, R., Butler, W., Jennings, W., Bioch. Biophys. Acta 54,
615 (1961).

- 50) Olson, R., Butler, W., Jennings, W., Biochim. Biophys. Acta 88, 651 (1964).
- 51) Sironval, C., Verly, W.G., Marcelle, R., Physiol. Plant. 14, 303 (1961).
- 52) Shlyk, A.A., Kaler, V.L., Vlasenok, L.I., Gaponenko, V.I., Photochem. Photobiol. 2, 129 (1963).
- 53) Shlyk, A.A., Ann. Review Plant Phys. 22, 169 (1971).
- 54) Krasnovskii, A.A., "Progress in Photosynthetic research". Metzner H. Ed., Laupp - Tübingen, 2, 709 (1969).
- 55) Frank, J. (1955) cité par Weier, T.E. et Benson, A.A. "Biochemistry of chloroplasts". T.W. Goodwin Ed., Academic Press London. 1, 91 (1966).
- 56) Criddle, R.S., "Biochemistry of chloroplasts". T.W. Goodwin Ed., Academic Press London. 1, 203 (1960).
- 57) Cherry, R.J., Chapman, D., Trans Faraday Soc. 64, 2304 (1968).
- 58) Latimer, P., Rabinowitch, F., J. Chem. Physics 24, 480 (1956).
- 59) Breton, J., Roux, E., Biochem. Biophys. Research Comm. 45, 557 (1971).
- 60) Rabinowitch, E., "La photosynthèse". Gauthier-Villars Ed., Paris, 41 (1958).
- 61) Claes, H., Z. Naturforsch 16 b, 445 (1961).
- 62) Clayton, R.K., Excited State in organic molecules dans "Molecular Physics in Photosynthesis". Blaisdell Publish. Cie, New York, 77 (1965).
- 63) Goedheer, J.C., Proc. Western Europ. Conf. Photosynth. 2nd Z., Netherl., 177 (1965).
- 64) Foote, C.S., Denny, W.R., J. Amer. Chem. Soc. 90, 6233 (1968).
- 65) Foote, C.S., Denny, W.R., J. Amer. Chem. Soc. 92, 5216 (1970).
- 66) Teale, F.W.J., Weber, G., Biochem. J., 66, 88 (1957).

- 67) Bellamy, W., Photochem. Photobiol. 3, 259 (1964).
- 68) Szabad, J., Bioch. Biophys. Acta 6, 468 (1971).
- 69) Szabad, J., Acta Physic. Chem. 18, 133 (1972).
- 70) Menke, W., Naturwiss. 28, 158 (1940).
- 71) Krasnovskii, A.A., Drozdova, N.N., Biokhimiia 25, 288 (1960).
- 72) Bellamy, W.D., Tweed, A.G., Nature, 197, 482 (1963).
- 73) Lavorel, J., Biochim. Biophys. Acta 88, 20 (1964).
- 74) Thomas, J.B., Kleinen Hammans, J.W., Arnolds, W.J.,
Biochim. Biophys. Acta 102, 324 (1965).
- 75) Lundegardh, H., Physiol. Plant. 19, 541 (1966).
- 76) Ke, B., Vernon, L.P., Seely, G.R., dans "The Chlorophylls"
Vernon and Seely Eds., Academic Press London (1966).
- 77) Vredenberg, W.J., Slooten, L., Biochem. Biophys. Acta 143, 583 (1967).
- 78) Sestak, Z., Catsky, J., Photosynth. 6, 442 (1972).
- 79) Butler, W., Proc. Nas. U.S. 69, 3420 (1972).
- 80) Katz, J.J., Naturwiss. 60, 32 (1973).
- 81) Vacek, K., Vavrince, E., Photochem. P. 17, 63 (1973).
- 82) Kijkmans, H., Eur. Jour. Biochem. 32, 233 (1973).
- 83) Zalesskii, I.K., Kotlo, V.N., Dokl. Akad. Nauk, SSSR, 210, 312 (1973).
- 84) Dans: "Research in Photosynthesis". H. Gaffron Ed.
Wiley Interscience. New York (1957).
- 85) Dans: "Photosynthesis and related processes". E.I. Rabinovitch Ed.,
I et II, Wiley Interscience. New York (1945), (1956).
- 86) Dans: "Molecular physics in Photosynthesis". R. Clayton Ed.,
Blaisdell Publis. Cie. New York (1965).
- 87) Emerson, R., Lewis, C.M., Amer. J. Botany 30, 165 (1943).
- 88) Emerson, R., Lewis, C.M., J. Gener. Physiol. 25, 579 (1942).

- 89) Dutton, H.J., Manning, W.M., J. Phys. Chem. 47, 308 (1942).
- 90) French, C.S., Young, V.K., J. Gen. Physiol. 35, 873 (1952).
- 91) Duysens, L.N.M., Bioch. Biophys. Acta 19, 1 (1956).
- 92) Livingston, R., Watson, W.F., J. Chem. Physics 18, 802 (1950).
- 93) Reid, C., J. Chem. Phys. 20, 1214 (1952).
- 94) Livingston, R., Ke, C.L., J. Amer. Chem. Soc. 72, 909 (1950).
- 95) Birks, J.B., Munro, H.I., "Progress in Reaction Kinetics" 4,
286, Pergamon (1967).
- 96) Tumerman, L.A., Dokl. Akad. Nauk SSSR, 117, 605 (1957).
- 97) Moffat Kelly J., Photochemical reactions of chlorophylls and
related compounds, Univ. de Londres (1969).
- 98) Seely, G.R., J. Chem. Physics 27, 125 (1957).
- 99) Gouterman, M., J. Chem. Physics 30, 1139 (1959).
- 100) Linschitz, H., Sarkanen, K., J. Amer. Chem. Soc. 80,
4826 (1958).
- 101) Pekkarinen, L., Linschitz, H., J. Amer. Chem. Soc. 82, 2407
(1960).
- 102) Rosenberg, J.L., Takashima, S., dans "Research in Photosynthesis".
H. Gaffron Ed., Wiley Interscience New York. 85 (1957).
- 103) Seely, G.R., "The Chlorophylls." Vernon and Seely Eds.
Academic Press. 530 (1968).
- 104) Mc Glynn, S.P., Azumi, T., Kasha, M., J. Chem. Physics 40, 507 (1964).
- 105) Mc Glynn, S.P., Smith, F.J., Cilento, G., Photochem. Photobiol. 3,
269 (1964).
- 106) Evans, D.F., J. Chem. Soc. 1735 (1960).
- 107) Evans, D.F., J. Chem. Soc. 2566 (1961).

- 108) Parker, C.A., Joyce, T.A., Photochem. Photobiol. 6, 395 (1967).
- 109) Cherry, R.J., Chapman, D., Langelaar, J., Trans. Faraday Soc. 64, 2304 (1968).
- 110) Sykes, W.A., Truscott, T.G., Chemical Society Meeting, Nottingham 1969.
- 111) Claes, H. et Nakayama, T.O.M., Nature 183, 1053 (1959).
- 112) Fujimori, E., Livingston, R., Nature 180, 1036 (1957).
- 113) Livingston, R., Pugh, A.C., Disc. Faraday Soc., 27, 144 (1959).
- 114) Krasnovskii, A.A., Drozdova, N.N., Dokl. Akad. Nauk SSSR 166, 223 (1966).
- 115) Krasnovskii, A.A., Drozdova, N.N., Biokhimiya 25, 288 (1960).
- 116) Krasnovskii, A.A., Drozdova, N.N., Molec. Biol. 1, 395 (1967).
- 117) Murty, N.R., Rabinowitch, E., J. Chem. Physics 41, 599 (1964).
- 118) Mathis, P., Vermeglio A., Photochem. Photobiol. 15, 157 (1972).
- 119) Land, E.J., Sykes, A., Truscott, T., Photochem. Photobiol. 13, 311 (1971).
- 120) Truscott, T., Land, E.J., Photochem. Photobiol. 17, 43 (1973).
- 121) Truscott, T., Chessing, M., Livingston, R., J. Chem. Physics 43, 3409 (1965).
- 122) Chessin, M., Livingston, R., Truscott, T., Trans. Faraday Soc. 62, 1519 (1966).
- 123) Buchwald, H.E., Wolf, C., Z. Naturforsch. 26, 51 (1971).
- 124) Losev, A.P., Byteva, T.M., Biofizika 17, 213 (1972).
- 125) Weedon, B.C.L., Chem. Blt. 3, 424 (1967).
- 126) Trosper, T., Allen, F., Plant Physiol. 51, 584 (1973).

- 127) Claes, H., Vortr. Gesamt. Bot. Deut., Bot. Ges. 1, 109 (1962).
- 128) Mathis, P., Photochem. Photobiol. 9, 55 (1969).
- 129) Singhal, G.S., Rabinowitch, E., J. Chem. Physics 49, 5206 (1968).
- 130) Claes, H., Biochem. Biophys. Research Comm. 3, 585 (1960).
- 131) Wolf, F.T., Stevens, M.V., Photochem. Photobiol. 6, 597 (1967).
- 132) Tric, C., Lejeune, V., Photochem. Photobiol. 12, 339 (1970).
- 133) Förster, Th., Naturwiss. 33, 166 (1946).
- 134) Förster, Th., Ann. Phys. 2, 55 (1948).
- 135) Dexter, D.L., J. Chem. Phys. 21, 836 (1953).
- 136) Perrin, J., Comp. Rend. Acad. Sci. Paris 184, 1097 (1927).
- 137) Perrin, F., Ann. Chem. Phys. 17, 283 (1932).
- 138) Vavilov, S.I. Z. Physik 22, 266 (1924).
- 139) Vavilov, S.I., Doklady Ac. Sc. URSS 34, 220 (1943).
- 140) Rabinowitch, E., "La photosynthèse" Gauthier - Villars Ed., Paris (1958).
- 141) Langmuir, I., J. Amer. Chem. Soc. 39, 1848 (1917).
- 142) Blodgett, K.B., J. Amer. Chem. Soc., 57, 1007 (1935).
- 143) Langmuir I., Schaefer, V.J., J. Amer. Chem. Soc. 59, 1951 et 2400 (1937).
- 144) Blodgett, K.J., Langmuir, I., Phys. Rev. 51, 964 (1937).
- 145) Taylor, J.E., J. Chem. Educ. 37, 204 (1960).
- 146) Leblanc, R., Orger, B. Research Report: An evaluation of monolayer techniques (1970).
- 147) Townes, Ch., Sciences 159, 699 (1968).
- 148) Moore, B., Ann. Rev. of Phys. Chem. 22, 387 (1971).

- 149) Rentzepis, P.M., Topp, M.R., Trans. N.Y. Acad. Sci., série 2, 33, 289 (1971).
- 150) Jones, W.J., Quart. Rev. 23, 73 (1969).
- 151) Haught, A.F., Ann. Rev. Phys. Chem. 19, 343 (1968).
- 152) Wilson, R.M., Ann. N.Y. Acad. Sci. 168, 615 (1970).
- 153) Bennet, W.R., Comments At. Mol. Physics 1, 15 (1969).
- 154) Eisenthal, K.B., Chem. Phys. Lett., 6, 155 (1970).
- 155) Rentzepis, P.M., Science 169, 239 (1970).
- 156) Patterson, L.K., Porter, G., Topp, M.R., Chem. Phys. Lett. 7, 612 (1970).
- 157) Seibert, M., Alfano, R., Stanley L. Shapiro. Biochem. Biophys. Acta 292, 493 (1973).
- 158) Gee, A.R., Truscott, T.G., Chem. Comm. 839 (1968).
- 159) Rentzepis, P.M., Photochem. Photobiol. 8, 579 (1968).
- 160) Bloom, A.L., Israel Journal of Technology 9, 205 (1971).
- 161) Sukarai, K., Broida, H.P., J. Chem. Physics 53, 1615 (1970).
- 162) Seely, G.R., Jensen, R.G., Spectrochim. Acta 21, 1835 (1965).
- 163) Kamlet, M.J., Organic Electronic spectral Data, I, II, III
Interscience, London (1960), (1966).
- 164) Leblanc, R.M., Orger, B.H., Biochem. Biophys. Acta 275, 102 (1972).
- 165) Pincus M., Windreich, S., Miller I.
Biochim. Biophys. Acta 275, 102 (1972).
- 166) Gaines, G.I., Insoluble monolayers at liquid gaz interfaces.
Référence: 18, chapitre 6, 281, (1966).
- 167) Turro, N.J. "Molecular Photochemistry". W.A. Benjamin Inc. Ed.
New York, chapitre V, 92 (1967).
- 168) Géacintov, N.E., Van Nostrand, F., IInd Inter. Con. Photosynthesis.
Stresa. 283 (1971).

- 169) Arnold, W., Meek, E.S. Arch. Biochem. Bioph. 60, 82 (1956).
- 170) Teale, F.W.J., Biochim. Biophys. Acta 42, 69 (1960).
- 171) Găacintov, N.E., Van Nostrand, F., Becker, J.F., Tinkel, J.B.,
Biochim. Biophys. Acta 267, 65 (1972).
- 172) Becker, J.F., Găacintov, N.E., Van Nostrand, F., Van Metter, R.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 597 (1973).
- 173) Goedheer, J.C., Biochim. Biophys. Acta 292, 665 (1973).
- 174) Junge, W., Eckhof, A., F.E.B.S. Letters 36, 207 (1973).
- 175) Cherry, R.J., Kwan Hsu, Chapman, D. Biochim. Biophys. Acta 267,
512 (1972).
- 176) Steinemann, A. Stark, G., Lüdger, P., J. Membrane Biol. 9,
177 (1972).